Spektralphotometrische Untersuchungen zur Wechselwirkung von Cytochrom-C und Chlorophyll-A mit dünnen Lipidschichten

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel
von

Adrian Steinemann
aus Bern und Opfertshofen

1970

Kreuzlingen 1971
Buchdruckerei Bodan AG

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546026_0008

Spektralphotometrische Untersuchungen zur Wechselwirkung von Cytochrom-C und Chlorophyll-A mit dünnen Lipidschichten

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel
von

Adrian Steinemann
aus Bern und Opfertshofen

Kreuzlingen 1971
Buchdruckerei Bodan AG

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
auf Antrag der

Herren Professoren Dr. P. Läuger und Dr. M. Thürkauf

Basel, den 20. November 1970

Prof. Dr. S. Fallab
Dekan

Meinem verehrten Lehrer Herrn Prof. Dr. P. Läuger möchte ich für die stete Förderung dieser Arbeit und viele anregende Diskussionen danken.

Mein Dank gebührt auch den Herren O. Marschall und W. Brodmann für den Bau des aktiven Filters sowie Herrn H. Dürr für den Bau des mechanischen Teiles der Apparatur.

Meiner Frau gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
E I N L E I T U N G	1
A P P A R A T U R E N	3
Anforderungen an ein Spektralphotometer	3
A. Einstrahlspektrometer	4
1. Prinzip	4
2. Beschreibung der Einzelteile	5
3. Linearität der Apparatur	9
4. Messgrenze	10
B. Differentialphotometer	12
1. Prinzip	12
2. Mechanischer Aufbau	12
3. Elektronischer Aufbau	15
4. Empfindlichkeit der Apparatur	20
5. Durchführung der Messung und Eichung der Apparatur	21
C. Trog zum Aufziehen von monomolekularen Schichten auf Glasplättchen nach der Langmuir-Blodgett-Methode	22
M E S S U N G E N U N D M E S S R E S U L T A T E	24
Ausgangsmaterial	24
A. Pigmenthaltige Dioleoyllecithinmembranen	24
1. Methode	24
2. Chlorophyll-a-haltige Dioleoyllecithinmembranen	26
3. Versuche mit Vitamin-K_1	30
4. Versuche mit β-Carotin	30
5. Diskussion	32
B. Wechselwirkung zwischen Phosphatidylinositol und Cytochrom-c	35
I. Adsorption von Cytochrom-c an bimolekulare Lipidmembranen	35
II. Adsorption von Cytochrom-c an monomolekulare Phosphatidylinositol-Schichten	38
1. Prinzip	38
2. Herstellung der Schichten	38
3. Messungen	40
a. Adsorptionsgeschwindigkeit	40
b. Stabilität der Bindung von Cytochrom-c an Phosphatidylinositol-Schichten	40

c. Reduktion von adsorbiertem Cytochrom-c 44
4. Diskussion 45
a. Adsorptionsgeschwindigkeit 45
b. Bindung als Funktion der Ionenstärke 46

A N H A N G

1. Ein einfaches Modell für die Adsorption von Cytochrom-c an eine geladene Lipidschicht 48
2. Schaltung des aktiven Filters 53

Z U S A M M E N F A S S U N G 54

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S 56

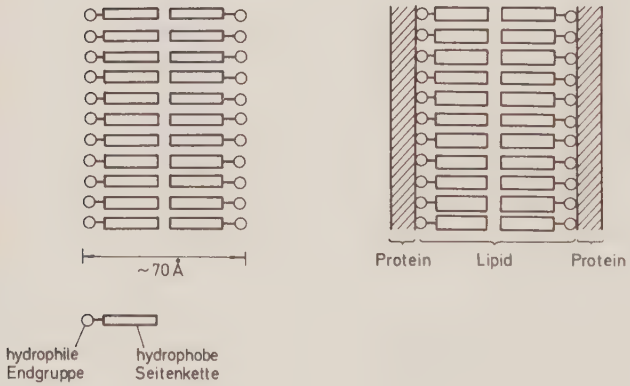
EINLEITUNG

Die Untersuchung natürlicher Zellmembranen bietet beim gegenwärtigen Stand der Technik noch vielerlei Schwierigkeiten. Man versucht deshalb, durch einfache Modellsysteme Aufschluss über gewisse Funktionsweisen der Membranen zu erhalten. Zwei wichtige Aufgaben des Zellmembransystems sind: 1. Die Bildung von Barrieren mit bestimmten Permeabilitätseigenschaften und 2. die Bildung geeigneter Strukturen, an denen bestimmte Prozesse ablaufen können. Zur Untersuchung der letzteren Aufgabe eignet sich das Modellsystem der monomolekularen Schichten an einer Wasser-Luft- oder Wasser-Oel-Grenzfläche. Zur Untersuchung von Permeabilitätseigenschaften und elektrischen Eigenschaften haben sich die 1963 von Müller et al. entdeckten bimolekularen Membranen[1,2,3] bewährt. Solche Membranen können aus gewissen amphiphilen Lipidmolekülen (d.h. Molekülen mit sowohl hydrophilen als auch hydrophoben Gruppen) mit einem geeigneten Lösungsmittel gebildet werden. Ihre Dicke wurde zu etwa 70 Å bestimmt, was etwa der doppelten Länge der membranbildenden Lipidmoleküle entspricht. Dies ist konsistent mit der vorgeschlagenen bimolekularen Struktur. Der hohe elektrische Widerstand dieser Membranen (etwa $10^8 \Omega\ cm^2$ in 0.1 M NaCl-Lösung) weist auf den Kohlenwasserstoffcharakter des Membraninnern hin. Man nimmt deshalb an, dass die Lipidmoleküle in der Membran orientiert sind und zwar mit den polaren Gruppen nach aussen gerichtet (vgl. Figur 1). Man kann nun von solchen einfachen Lipidmembranen ausgehen und daraus komplizierter zusammengesetzte molekulare Strukturen aufbauen. Dies geschieht entweder durch Beimischung von geeigneten Molekülen zur membranbildenden Lösung oder durch Adsorption von z.B. Proteinen aus der wässrigen Phase. Im letzteren Falle sind dem Davson-Danielli-Modell[4] entsprechende Strukturen zu erwarten (vgl. Figur 1).

Elektronenmikroskopaufnahmen von Chloroplasten[5] und Mitochondrien[6] zeigen, dass diese Organellen im wesentlichen aus etwa 100 Å dicken Lipoproteinmembranen aufgebaut sind. Aus anderen Beobachtungen weiss man, dass Chlorophyll in die Chloroplastenmembran eingelagert ist und dort mindestens bezirksweise in monomolekularer Schicht vorliegt. Aehnliches gilt für das in den Mitochondrien enthaltene Cytochrom-c.

Im folgenden sollen Versuche beschrieben werden, die zeigen, dass man ähnliche Strukturen auf künstlichem Wege gewinnen kann. Dabei werden wir uns sowohl des Modelles der Monoschichten als auch desjenigen der bimolekularen Membranen bedienen. Es soll aber nicht versucht werden, natürliche Membranen nachzuahmen, sondern es sollen einfache Gebilde hergestellt werden, an denen die Wechselwirkung der einzelnen Komponenten untersucht werden kann.

Moleküle wie Chlorophyll, Cytochrom-c und β-Carotin lassen sich am einfachsten durch ihre Lichtabsorption nachweisen. Wir bedienten uns hierbei eines eigens zu diesem Zwecke hergestellten Spektralphotometers. Die Pigmentmoleküle lassen sich damit quantitativ in den Modellsystemen nachweisen. Daraus ergeben sich unter anderem interessante Hinweise auf den Bildungsmechanismus und die Struktur bimolekularer Membranen.



Figur 1: a. Bimolekulare Membran
b. Davson-Danielli-Modell

A P P A R A T U R E N

Viele der in der Natur vorkommenden Pigmente wie Chlorophyll, β-Carotin und Cytochrome haben im sichtbaren Bereich des Spektrums Extinktionskoeffizienten von der Grössenordnung 10^4 bis $10^5 cm^2 M^{-1}$. Auf Grund dieser starken Absorption lassen sich noch kleine Mengen von solchen Molekülen spektralphotometrisch nachweisen.

Anforderungen an ein Spektralphotometer

Bei Messungen an pigmenthaltigen bimolekularen Membranen können wir in günstigen Fällen eine bimolekulare Farbstoffschicht erwarten. Wir wollen nun die Absorption einer monomolekularen Pigmentschicht abschätzen.

Zwischen dem molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten ε und dem molaren Absorptionsquerschnitt σ besteht die Beziehung:

$$(1) \qquad \sigma = \frac{1000}{2.30 \cdot N_L} \varepsilon = 3.84 \cdot 10^{-21} \varepsilon \ [cm^2]$$

N_L = Loschmidt'sche Zahl

Den Extinktionskoeffizienten ε kennen wir aus Messungen an Lösungen. Die Absorptionswahrscheinlichkeit W für ein Photon, das auf eine monomolekulare Schicht senkrecht auftrifft, ist:

$$(2) \qquad W = \frac{\sigma}{A}$$

A = Flächenbedarf des Pigmentmoleküls in der Monoschicht

Diese Gleichung gilt nur dann exakt, wenn der Extinktionskoeffizient in der Lösung gleich gross ist wie in der Membran und wenn das Molekül in Bezug auf die Absorption isotrop ist oder in der Schicht keine Vorzugsrichtung besitzt. Der Extinktionskoeffizient von Chlorophyll-a in Benzol in der Soretbande (430 nm) beträgt $\varepsilon = 1.25 \cdot 10^5 cm^2 M^{-1}$. Daraus ergibt sich nach (1) $\sigma = 4.8$ Å^2. Der Porphyrinring ist etwa kreisförmig und hat einen Durchmesser von ungefähr 17 Å. Bei dichtester Packung ergibt sich daraus ein Flächenbedarf von A = 251 Å^2, falls die Porphyrinringe in der

Schichtebene liegen. Die Absorptionswahrscheinlichkeit wird dann nach (2) W = 0.02, daraus ergibt sich eine optische Dichte E = lg I_o/I = 0.009 (I_o,I bedeuten die Intensität des Messlichtes vor bzw. nach dem Durchgang durch die Probe). Monomolekulare Schichten von den anderen erwähnten Pigmenten ergeben optische Dichten derselben Grössenordnung. Eine optische Dichte von 10^{-2} ist aber gerade etwa die Messgrenze eines gebräuchlichen Spektrometers. Will man nun noch zehnmal verdünntere Farbstoffschichten auf 10% genau messen, so ist eine Apparatur erforderlich, mit der man optische Dichten bis 10^{-4} messen kann. Da solche Geräte auf dem Markt nicht existieren, haben wir selbst eine solche Apparatur gebaut.

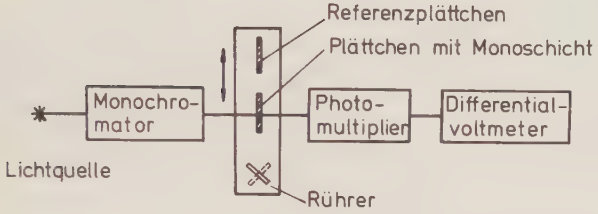
Diese sollte möglichst vielseitig verwendbar sein. Daher sind wir nach dem Baukastenprinzip vorgegangen. Zunächst wurde ein Einstrahlspektrometer aufgebaut, das dann später zu einem Differentialphotometer erweitert wurde. Lampe, Monochromator, Küvettengehäuse sowie Photomultiplier mit Vorverstärker bildeten selbständige Einheiten, die auf eine optische Bank montiert wurden und leicht ausgewechselt werden konnten. Zum Betrieb der Lampe und des Photomultipliers wurden käufliche stabilisierte Netzgeräte verwendet.

A. Einstrahlspektrometer

1. Prinzip

Das Prinzip des Einstrahlspektrometers geht aus Figur 2 hervor. Das Licht einer Halogen-Wolfram-Lampe wird auf den Eintrittsspalt eines Monochromators fokussiert und in diesem spektral zerlegt. Das monochromatische Licht geht dann durch ein Küvettengehäuse. In diesem kann durch eine Schiebevorrichtung abwechselnd die Probe oder die Referenz in den Strahlengang gebracht werden. Schliesslich wird das Licht durch eine Linse auf die Photokathode eines Photomultipliers fokussiert. Der Photomultiplier liefert einen zur Lichtstärke proportionalen Strom, ein Vorverstärker sorgt für weitere Verstärkung des Messignals. Die Ausgangsspannung des Vorverstärkers wird dann mit einem Präzisionsvoltmeter gemessen. Die Referenz im Strahlengang liefert das

Ausgangssignal U_o, die Probe im Strahlengang liefert die Ausgangsspannung U. Da sich diese linear mit der Lichtintensität I ändert, ergibt sich daraus die optische Dichte $E = \lg I_o/I = \lg U_o/U$.



Figur 2: Einstrahlspektrometer zur Untersuchung dünner Filme

2. Beschreibung der Einzelteile des Einstrahlspektrometers

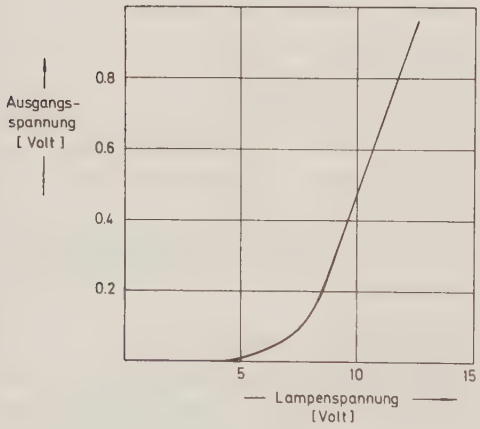
a. Lampe

Bei einer Einstrahlmethode ist es wichtig, dass insbesondere die Lichtquelle sehr stabil ist, da Schwankungen der Lichtintensität eine direkt proportionale Schwankung des Ausgangssignales zur Folge haben. Bei der Konstruktion der Lampe musste deshalb auf gute mechanische und thermische Stabilität geachtet werden. Wir verwendeten eine Halogen-Wolfram-Lampe (Osram 12 Volt, 50 Watt). Diese Lampe lieferte von einigen getesteten Lampen das stabilste Licht. Die Lampe wurde auf einen Messingklotz mit den Dimensionen 15 cm x 18 cm x 5 cm montiert. Der Messingklotz war von Kanälen durchzogen, durch welche thermostatisiertes Wasser (25°C) gepumpt wurde. Das IR-Licht wurde von einem Interferenz-Wärmereflexionsfilter (Balzers Typ Cal-

flex-C) reflektiert. Dadurch wurde eine zu starke Erhitzung des Monochromator-Eintrittsspaltes verhindert.

b. Netzgerät für die Lampe

Will man mit einer Einstrahlmethode optische Dichten der Grössenordnung 10^{-4} messen, so muss die Leistung der Lichtquelle auf etwa 1 : 10^{-4} konstant gehalten werden. Aus Figur 3 geht hervor, dass in der Umgebung der Betriebsspannung der Lampe (12 V) die Leistung sich linear mit der Lampenspannung ändert. Diese muss deshalb ebenfalls auf etwa 1 : 10^{-4} konstant gehalten werden. Zur Speisung der Lampe wurde daher ein hochstabilisiertes Netzgerät (Hewlett-Packard Modell 6966 A) verwendet. Die Schwankung der von diesem Gerät abgegebenen Spannung ist bei einer Aenderung der Netzspannung um 10% kleiner als 0.01%.



Figur 3: Spannung am Ausgang des Vorverstärkers als Funktion der Lampenspannung; Betriebsspannung der Lampe 12 Volt.

c. Monochromator

Zur spektralen Zerlegung des Messlichtes verwendeten wir einen Gittermonochromator (0.25 Meter Ebert Monochromator von Jarrell-Ash). Die Spaltbreite wurde je nach Versuch zwischen

100 und 1000 Mikron variiert. Das Auflösungsvermögen mit dem 100 Mikronspalt beträgt 5 Å bei einer Wellenlänge von 3131 Å. Der Streulichtanteil ist kleiner als 0.3% bei 3000 Å.

d. Küvettengehäuse

Das Küvettengehäuse wurde mit einer Schiebevorrichtung versehen, die es erlaubte, zwei Glasplättchen abwechslungsweise in den Strahlengang zu bringen. Der untere Teil der Gläschen tauchte in eine feststehende Küvette. Der Lichtstrahl durchquerte die mit Lösung gefüllte Küvette und abwechslungsweise das Probe- oder Referenzplättchen; dabei wurde etwa 1 cm^2 der Plättchen beleuchtet. Ein Mikromotor mit einem Teflonrührer sorgte für die Durchmischung der Lösung.

e. Photomultiplier und Vorverstärker

Der Photomultiplier und der Vorverstärker wurden in ein gemeinsames Gehäuse eingebaut. Wir verwendeten die beiden Photomultipliertypen:

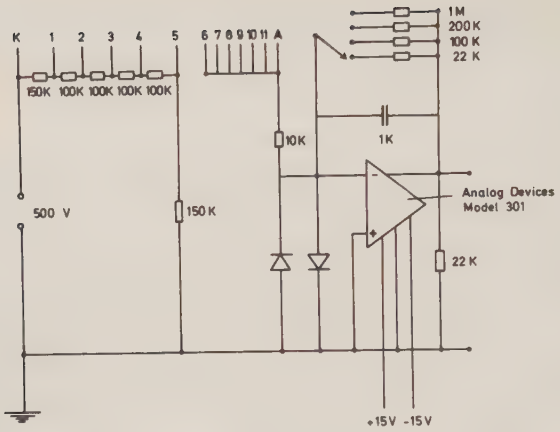
1. EMI Typ 6256 S, 13 Stufen, SbCs-Photokathode, Bereich 1650 Å bis 6500 Å.
2. EMI Typ 9558 B, 11 Stufen, Trialkali S 20 Photokathode, Bereich 4000 Å bis 8000 Å.

Beim Typ 6256 S wurden nur die sechs ersten Stufen verwendet. Die Dynoden 6 bis 12 wurden mit der Anode verbunden. Der Photomultiplier wurde mit 1200 Volt betrieben.

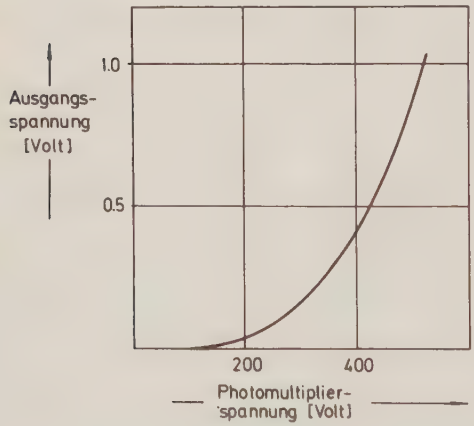
Beim Typ 9558 B wurden die ersten fünf Stufen verwendet. Die restlichen Dynoden wurden wieder mit der Anode verbunden. Die Betriebsspannung betrug 500 Volt. Figur 4 zeigt die verwendete Schaltung. Diese Schaltungen erlauben es, die Photomultiplier stark zu belichten, ohne dass diese Schaden nehmen.[10] Eine hohe Lichtintensität ist wichtig zur Unterdrückung des Schrotrauschens der Photokathode. Ein Highgain Operationsverstärker Typ 301 von Analog Devices diente als Vorverstärker.

f. Hochspannungsgerät für den Photomultiplier

Schwankungen der Hochspannung des Photomultipliers ändern den Verstärkungsgrad des Photomultipliers über ein Exponential-



Figur 4: Schaltung für den Photomultiplier Typ 9558 B
K = Photokathode des Photomultipliers
1 bis 11 = Dynoden
A = Anode



Figur 5: Spannung am Ausgang des Vorverstärkers als Funktion der Photomultiplierspannung; Betriebsspannung bei spektralphotometrischen Messungen 500 Volt.

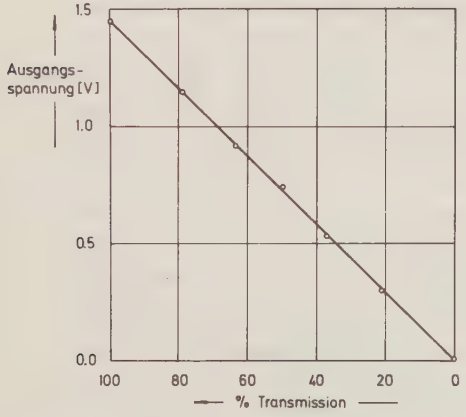
gesetz. Die Abhängigkeit des Ausgangssignales als Funktion der Photomultipliersspannung ist in Figur 5 dargestellt. Die Hochspannung muss deshalb gut stabilisiert sein. Als Netzgerät verwendeten wir das John Fluke Modell 405 B, 3000 Volt. Die Schwankung der abgegebenen Spannung ist bei einer Schwankung der Netzspannung um 10% kleiner als 0.005%.

g. Voltmeter

Die Ausgangsspannung der Vorverstärkers muss auf 10^{-2}% genau gemessen werden können. Dazu diente ein John Fluke AC/DC Differential-Voltmeter Modell 873 A. Mit diesem Modell kann man Spannungen von 1 bis 1000 Volt auf 0.01% genau messen.

3. Linearität der Apparatur

Zur Prüfung der Linearität der Apparatur wurden Graufilter mit bekannter Transmission in den Strahlengang geschoben. In Figur 6 ist die Transmission gegen das gemessene Ausgangssignal aufgetragen. Aus der Kurve ist ersichtlich, dass die Apparatur im gemessenen Bereich linear arbeitet.



Figur 6: Ausgangsspannung des Vorverstärkers als Funktion der Transmission der in den Strahlengang gebrachten Graufilter

4. Messgrenze

Bei Messungen mit Photomultipliern bildet im allgemeinen das Schrotrauschen der Photokathode den für die Messung begrenzenden Faktor.[11,12] Für das Schrotrauschen gilt die Formel:[13,14]

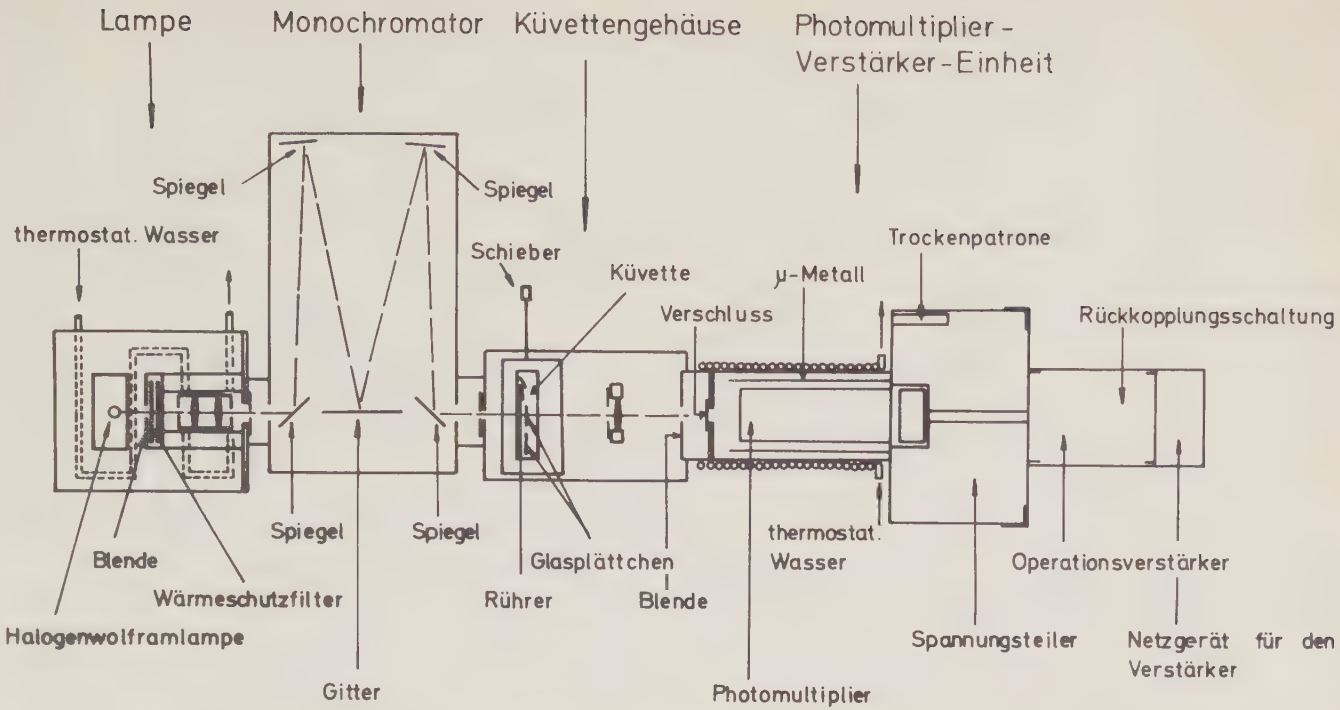
$$(3)\quad \frac{\sqrt{\overline{\Delta i_o^2}}}{i_o} = \sqrt{2e\,\frac{\Delta f}{i_o}}$$

i_o = Photokathodenstrom
Δf = Bandbreite des gesamten elektronischen Systems
e = Elementarladung

Das Schrotrauschen hängt also nur von der Bandbreite des elektronischen Systems und dem Photokathodenstrom ab. Unsere Photomultiplierschaltung erlaubte es, die Lichtstärke und damit den Photokathodenstrom soweit zu erhöhen, dass das Schrotrauschen nicht mehr den begrenzenden Faktor bildete.

Bei unseren Messungen war dann die Stabilität der Lampe der limitierende Faktor. Die Speisespannung der Lampe wurde auf 0.01% konstant gehalten. Aus Figur 3 ergibt sich dann eine relative Schwankung am Ausgang des Vorverstärkers von $2 \cdot 10^{-2}$%. Die gemessenen Signalschwankungen waren für Zeiten unter 2 Minuten etwa $5 \cdot 10^{-2}$%. Das heisst, es konnten optische Dichten von der Grösse $5 \cdot 10^{-4}$ noch gemessen werden. Die aus der Stabilität der Lichtquelle abgeschätzte Messgrenze konnte somit annähernd erreicht werden. Bei Langzeitmessungen, das heisst, wenn zwischen der Messung der Probe und der Messung der Referenz eine Zeit von mehr als 2 Minuten verging, wirkte sich die unregelmässige Drift der Apparatur störend auf die Messungen aus. Das Einstrahlspektrometer war deshalb besonders für die Messungen der auf Glasplättchen aufgezogenen Pigmentschichten geeignet, da man bei diesen Messungen Probe und Referenz rasch abwechslungsweise in den Strahlengang bringen konnte.

Für die Messungen an den Lipidmembranen war das Gerät nicht geeignet. Beim raschen Verschieben der Membran in der Lösung traten in jener Strömungen auf, die Material vom Randwulst in den dünnen Film beförderten. Für Messungen an Lipidmembranen haben wir deshalb das Einstrahlspektrometer zu einem Differentialphotometer erweitert.


Lampe
Monochromator
Küvettengehäuse
Photomultiplier-
Verstärker-Einheit
Spiegel
Spiegel
thermostat. Wasser
Schieber
Küvette
µ-Metall
Trockenpatrone
Verschluss
Rückkopplungsschaltung
Spiegel
Spiegel
Blende
Wärmeschutzfilter
Halogenwolframlampe
Rührer
Glasplättchen
Blende
thermostat.
Wasser
Operationsverstärker
Gitter
Photomultiplier
Spannungsteiler
Netzgerät für den
Verstärker

B. Differentialphotometer

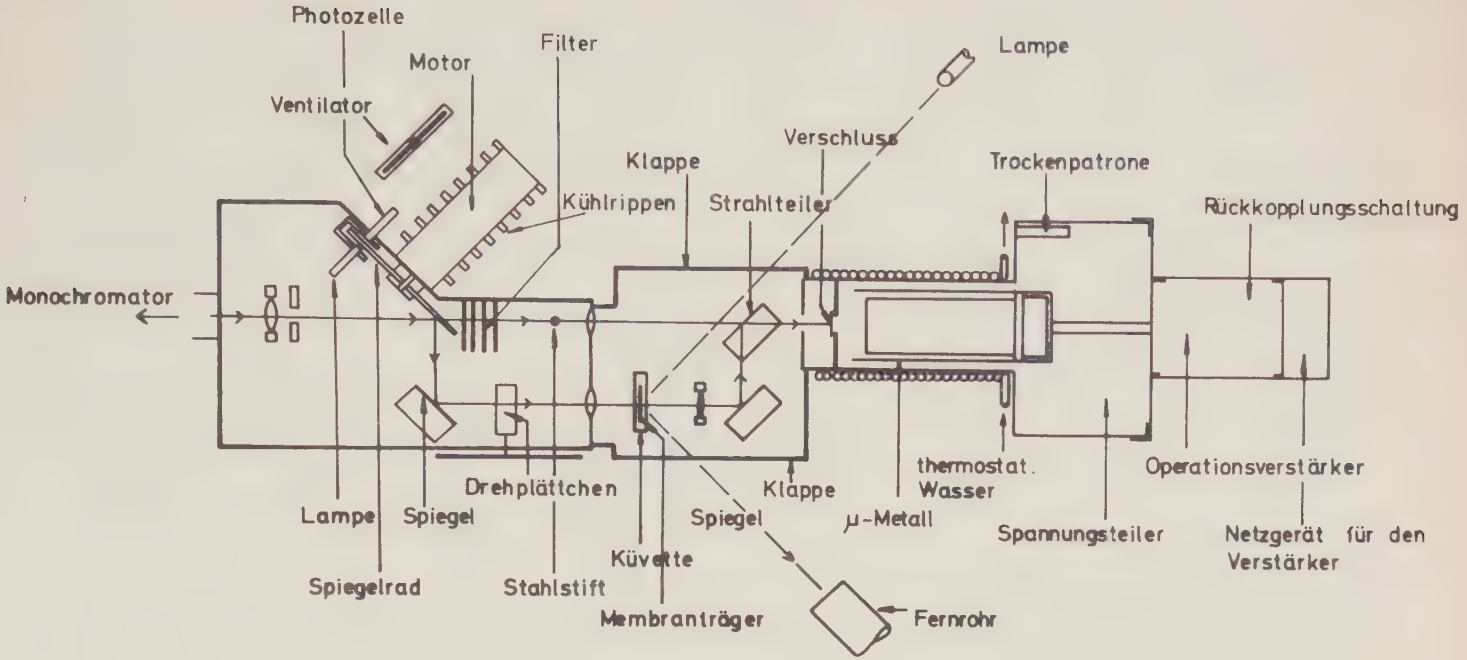
1. Prinzip

Das Prinzip des Differentialphotometers geht aus Figur 8 hervor. Das Photometer ist eine Weiterentwicklung der von Frieser und Brandt gebauten Apparatur.[15,16]

Monochromatisches Licht fällt auf eine zur Hälfte verspiegelte, mit 4200 Umdrehungen pro Minute rotierende Glasscheibe. Der Lichtstrahl wird durch die rotierende Glasscheibe in zwei Strahlen aufgeteilt. Ist der lichtdurchlässige Teil des Spiegelrades im Strahlengang, so wird das Licht direkt von einer Linse auf die Photokathode fokussiert. Ist der verspiegelte Teil der Glasscheibe im Strahlengang, so wird das Licht um 90° abgelenkt, fällt dann auf einen zweiten Spiegel, der das Licht nochmals um 90° ablenkt. Durch eine Linse wird dann das Licht auf die Probe fokussiert. Nach dem Durchgang durch die Probe werden beide Lichtstrahlen wieder vereinigt und auf die Photokathode des Photomultipliers fokussiert. Dazu dienen eine weitere Linse, ein Spiegel und ein halbdurchlässiger Spiegel. Durch partielle Ausblendung und Graufilter werden zunächst die beiden Lichtstrahlen aufeinander abgeglichen. Dann wird die Probe in den Strahlengang gebracht. Der Photomultiplier liefert dann ein zur Intensitätsdifferenz der beiden Lichtstrahlen proportionales elektrisches Rechtecksignal, das einem Gleichstromsignal überlagert ist. Das Rechtecksignal wird über einen Schmalbandverstärker einem Hallmultiplikator zugeführt. Durch ein elektrooptisches System am Spiegelrad wird ein Steuersignal erzeugt, das dieselbe Frequenz wie das Spiegelrad besitzt und phasengleich mit dem Hauptsignal ist. Das Referenzsignal wird ebenfalls über einen Schmalbandverstärker dem Hallmultiplikator zugeführt. Der Hallmultiplikator liefert eine zum Produkt der beiden Signale proportionale Spannung. Nach einer Integration in einem RC-Glied ergibt sich eine zur Absorption der Probe proportionale Gleichspannung, die mit einem Röhrenvoltmeter gemessen wird.

2. Mechanischer Aufbau

Die Lampe, der Monochromator und die Photomultiplier-Verstär-


Photozelle
Motor
Filter
Lampe
Ventilator
Verschluss
Klappe
Trockenpatrone
Kühlrippen
Strahlteiler
Rückkopplungsschaltung
Monochromator
Drehplättchen
Klappe
thermostat.
Wasser
Operationsverstärker
Lampe
Spiegel
Spiegel
µ-Metall
Spannungsteiler
Netzgerät für den
Verstärker
Küvette
Spiegelrad
Stahlstift
Membranträger
Fernrohr

ker-Einheit wurden ohne Aenderung vom Einstrahlspektrometer übernommen. Zwischen den Monochromator und den Photomultiplier wurde ein Motorengehäuse und ein neues Küvettengehäuse eingebaut. Das Motorengehäuse enthielt einen Synchronmotor (Dunker SY 42 x 60 - 2). Dieser wurde mit Kühlrippen umgeben, ein Ventilator sorgte für die notwendige Luftzirkulation. Der Motor wurde mit einer Wechselspannung von 70 Hz und einer Spannung von V_{ss} = 80 Volt (V_{ss} = Spitzen-Spitzenspannung) betrieben. Auf die Motorenachse wurde das Spiegelrad (Francke GmbH Giessen) montiert. Das Spiegelrad hatte einen Durchmesser von 14 cm und eine Dicke von 0.50 cm. Vor dem Spiegelrad wurde eine kleine 1.7 Volt-Lampe senkrecht zur Spiegelebene montiert. Auf der gleichen Achse hinter dem Spiegelrad wurde eine Photozelle (Visolux Typ ML 2) befestigt, die das Licht der Lampe empfing. Durch das rotierende Spiegelrad wurde der Lichtstrahl periodisch mit 70 Hz unterbrochen und an der Photozelle wurde eine Wechselspannung gleicher Frequenz erzeugt.

Die beiden Lichtstrahlen hatten im allgemeinen verschiedene Intensität. Da die beiden Strahlen sehr genau aufeinander abgeglichen werden mussten, waren spezielle Einrichtungen erforderlich. Zum Grobabgleich dienten Graufilter. Zum Feinabgleich diente ein an einer Mikrometerschraube befestigter, mit Russ geschwärzter Stahlstift, der in den Strahlengang geschoben wurde. Der Stift hatte einen Durchmesser von 1.5 mm. Weiter diente zum Feinabgleich ein Glasplättchen, das im Strahlengang gedreht werden konnte. Entsprechend den Fresnel'schen Gesetzen ändert sich die Reflexion und somit das durchgelassene Licht mit dem Einfallswinkel des Lichtstrahles auf das Glasplättchen. Damit lassen sich die beiden Strahlen sehr fein aufeinander abgleichen. Der Winkel des Plättchens gegen den Lichtstrahl konnte an einer Skala abgelesen werden.

Das Küvettengehäuse enthielt auch die für die Wiedervereinigung der beiden Lichtstrahlen und deren Fokussierung auf die Photokathode notwendigen Linsen und Spiegel. Wir verwendeten Oberflächenspiegel Typ Alflex C von Balzers. Als Lichtteiler verwendeten wir den Typ TF-MT-45 von Balzers.

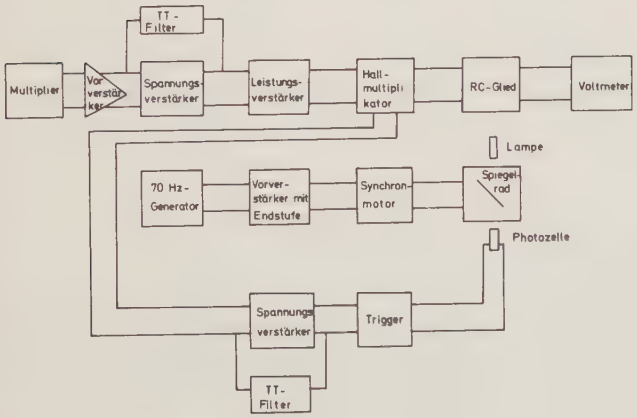
In die Küvette (1 cm x 6 cm x 2 cm) führten vier Teflonschläuche. Zwei Schläuche dienten zum Austausch der Lösung. Durch einen weiteren Schlauch konnten mit einer Mikropipette definierte Mengen von Farbstofflösungen in die Küvette gespritzt werden.

Durch den vierten Schlauch wurde zur Durchmischung der Lösung Argon in die Flüssigkeit geblasen. In die Küvette wurde ein Teflonplättchen mit einem kreisrunden Loch vom Durchmesser 6 mm gesteckt. Ueber diese Oeffnung wurden die Lipidmembranen aufgezogen. Das Teflonplättchen wurde am Küvettengehäuse angeschraubt und konnte so justiert werden, dass der Lichtstrahl genau auf die Lochmitte fokussiert wurde. In der Membranebene hatte der Lichtstrahl dann einen Querschnitt von 1.5 x 1.5 mm. Der bei der Membranbildung stets auftretende Randwulst wurde so von der Messung ausgeschlossen. Der Referenzstrahl verlief ausserhalb der Küvette (vgl. Figur 8). Vor und hinter dem Teflonplättchen wurde je eine Platinelektrode montiert. Durch Anlegen einer Spannung von ca. 500 mV an diese Elektroden konnten die Membranen zerstört werden.

3. Elektronischer Aufbau

Die Schaltung des Differentialphotometers (vgl. Blockschema Figur 9 und Schaltplan Anhang S. 53) beschreiben wir in vier Teilen:

a. Verarbeitung des Messignals
b. Erzeugung der 70 Hz-Wechselspannung
c. Verarbeitung des Steuersignales
d. Multiplikationselement und Integrationsglied



Figur 9: Blockschema der Schaltung

a. Verarbeitung des Messignales

Wir verwendeten dieselben Photomultipliertypen mit denselben Schaltungen wie beim Einstrahlgerät (vgl. Figur 4). Auf die Photokathode fiel ein mit 70 Hz modulierter Lichtstrahl. Photomultiplier und Vorverstärker erzeugten eine zur Intensität des Lichtes proportionale Gleichspannung. An den Vorverstärker wurde ein Selektivverstärker (70 Hz) kapazitiv gekoppelt, damit wurde der Gleichstromanteil des Signales eliminiert. Der Selektivverstärker verstärkte die 70-Hz-Komponente maximal. Signale mit anderen Frequenzen wurden herausgefiltert. Dadurch wurde das vom Photomultiplier herrührende Rauschen bereits stark unterdrückt. Die Bandbreite des Verstärkers war durch das TT-Filter in der Rückkopplung bestimmt und betrug 2 Hz. Zur Anpassung des Verstärkers an den niederohmigen Eingang des Hallmultiplikators diente ein Leistungsverstärker. Dieser lieferte dann den Steuerstrom des Hallmultiplikators. Als Verstärkerelemente verwendeten wir lineare integrierte Schaltkreise Typ LM 300.

b. Erzeugung der 70-Hz-Wechselspannung

Um das vom Netz herrührende 50-Hz-Rauschen zu vermeiden, wurde der Synchronmotor des Spiegelrades mit einem netzunabhängigen 70-Hz-Generator betrieben. Die 70-Hz-Wechselspannung wurde von einem Stimmgabeloszillator (Souriau Boulogne Billancourt Typ 8D 15 J4 GS 7024; Langzeitstabilität $5 \cdot 10^{-5}$) erzeugt und von einem Verstärker auf die für den Betrieb des Motors notwendige Spannung von V_{ss} = 80 Volt verstärkt. Zum Starten des Motors konnte die Leistung kurzzeitig mittels einer Startvorrichtung erhöht werden.

c. Verarbeitung des Steuersignales

Die durch das elektrooptische System am Spiegelrad erzeugte 70-Hz-Wechselspannung wurde über eine Triggerstufe einem auf 70 Hz abgestimmten Selektivverstärker zugeführt. Der Verstärker war vom gleichen Typ wie der in Abschnitt a. beschriebene Selektivverstärker. Die resultierende Spannung erzeugte das Steuerfeld des Hallmultiplikators. Das elektrooptische System, das aus

einer Lampe und einer Photozelle bestand, konnte längs des Spiegelrades verschoben werden. Dadurch konnte das Steuersignal mit dem Hauptsignal in Phase gebracht werden.

d. Hallmultiplikator und Integrationsglied

Der Hallmultiplikator (Siemens Typ MB 26 EI 38/MV) und das anschliessende RC-Glied bewirkten:

1. die Unterdrückung von Signalen mit Frequenzen, die nicht gleich 70 Hz waren,
2. die Unterdrückung von 70-Hz-Signalen, die nicht mit dem Hauptsignal in Phase waren.

Nach dem Durchgang durch die Selektivverstärker bestanden das Haupt- und das Steuersignal im wesentlichen aus einer 70-Hz-Komponente. Diesen Signalen waren Rauschsignale mit Frequenzen, die dem Durchlassbereich der Selektivverstärker entsprachen (etwa 69 -71 Hz), überlagert. Die dem Steuersignal überlagerten Rauschsignale konnten wegen ihrer Kleinheit vernachlässigt werden. Das Hauptsignal enthält im allgemeinen noch Rauschsignale verschiedener Frequenzen und Phasen, die bei kleinen Extinktionen von der Grössenordnung des Hauptsignals sind. Aus diesem Grunde wurde das Signal in einem Hallmultiplikator weiterverarbeitet.

Werden zwei Sinussignale $A = A_o \sin\omega_o t$, $B = B_o \sin(\omega_1 t + \varphi)$ verschiedener Frequenz (ω_o, ω_1) und Phase φ miteinander multipliziert, so erhält man

$$(4) \qquad AB = \frac{A_o B_o}{2} \cos[(\omega_o - \omega_1)t - \varphi] - \frac{A_o B_o}{2} \cos[(\omega_o + \omega_1)t + \varphi] .$$

Messignal und Steuersignal haben dieselbe Frequenz, d. h. es ist $\omega_o = \omega_1$. Ihr Produkt ist dann gegeben durch

$$(5) \qquad AB = \frac{A_o B_o}{2} \cos\varphi - \frac{A_o B_o}{2} \cos(2\omega_o + \varphi).$$

Es ergibt sich somit ein von einem Wechselspannungssignal überlagertes Gleichspannungssignal, das proportional zur Absorption ist und das maximal wird, wenn die Phase auf Null abgeglichen ist. Ausser Phase befindliche Rauschsignale der Frequenz ω_o werden mit dem Cosinus ihres Phasenwinkels geschwächt. Zur weiteren Filterung verwendeten wir ein RC-Glied mit variabler Zeitkonstante (0.4 sec bis 16 sec). Ohne RC-Glied wird die Bandbreite des elektronischen Systems im wesentlichen durch den Selektivverstärker bestimmt (Δf = 2 Hz). Durch Vergrösserung der Zeitkonstanten kann die Bandbreite verkleinert werden. Haben wir am Eingang des Hallmultiplikators das Signal $B = B_o \sin\omega_1 t$, so ergibt sich nach (4) am Ausgang des Multiplikators das Signal

$$AB = X + Y \tag{6}$$

mit den Komponenten

$$X = \frac{A_o B_o}{2} \cos(\omega_o - \omega_1)t \tag{7}$$

$$Y = \frac{A_o B_o}{2} \cos(\omega_o + \omega_1)t \ ,$$

wenn das Steuersignal $A = A_o \sin\omega_o t$ ist. Nach dem Durchgang durch das RC-Glied liefert die Komponente X das Signal[17]

$$U_1 = \frac{1}{\sqrt{1 + (\omega_o - \omega_1)^2 R^2 C^2}} \cdot X \tag{8}$$

und die Komponente Y

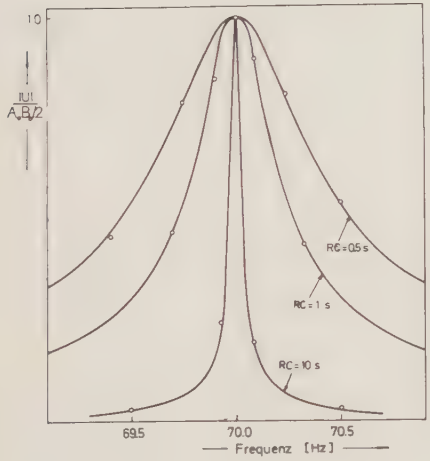
$$U_2 = \frac{1}{\sqrt{1 + (\omega_o + \omega_1)^2 R^2 C^2}} \cdot Y \tag{9}$$

Da in den Hallmultiplikator wegen des vorgeschalteten Selektivverstärkers nur Signale aus dem Frequenzbereich 69 bis 71 Hz eintreten, wird U_2 um mindestens einen Faktor 100 stärker geschwächt als U_1. Wir können deshalb U_2 gegenüber U_1 vernachlässigen. Wir erhalten dann aus (7) und (8) die Aus-

gangsspannung U des RC-Gliedes:

$$(10) \qquad U \simeq U_1 = \frac{\frac{A_o B_o}{2} \cos(\omega_o - \omega_1)t}{\sqrt{1 + (\omega_o - \omega_1)^2 R^2 C^2}}$$

In Figur 10 ist das experimentell bestimmte Verhältnis $|U| / \frac{A_o B_o}{2}$ mit dem nach Gleichung (10) berechneten Verhältnis verglichen. Zur Bestimmung der experimentellen Werte wurden mit einem Sinusgenerator Signale verschiedener Frequenz in den Hallmultiplikator eingegeben und die Ausgangsspannung des RC-Gliedes gemessen. Aus der Figur lässt sich die Bandbreite des elektronischen Systems ermitteln.



Figur 10: Normierte Ausgangsspannung $|U| / \frac{A_o B_o}{2}$ des RC-Gliedes als Funktion der Frequenz eines Signales am Eingang des Hallmultiplikators. Die Kurven wurden bei Zeitkonstanten von 0.5 sec, 1 sec und 10 sec bestimmt. ... experimentelle Werte, —— berechnete Kurven

4. Empfindlichkeit der Apparatur

Bei einer Zweistrahlmethode machen sich Schwankungen in der Lichtintensität nur als relative Aenderungen im Wechselstromsignal am Photomultiplierausgang bemerkbar. Die Lampe stellt also bei dieser Methode nicht mehr den begrenzenden Faktor in der Empfindlichkeit dar. Dagegen begrenzt nun das Schrotrauschen die Empfindlichkeit der Apparatur. Zur Abschätzung des Schrotrauschens (vgl. S. 10) müssen wir die Bandbreite des elektronischen Systems Δf und den Photokathodenstrom i_o kennen. Die Bandbreite ergibt sich aus Figur 10: der Photokathodenstrom i_o ist gegeben durch den messbaren Ausgangsstrom und den Verstärkungsgrad des Photomultipliers. Zur Abschätzung von i_o wurde der Photomultiplier Typ 6256 S mit 150 Volt zwischen der Photokathode und der ersten Dynode und je 67 Volt zwischen den folgenden Dynoden betrieben. Unter diesen Bedingungen ist der Verstärkungsgrad bekannt und gleich $0.57 \cdot 10^6$ (EMI-Datenblatt zu PM-Typ 6256 S). Bei einem gemessenen Ausgangsstrom $i = 10^{-5}$A (Monochromatorspalt 100μ, 430 nm) ergibt sich ein Photokathodenstrom von $i_o = 1.75 \cdot 10^{-11}$A. Die folgende Tabelle zeigt die theoretisch erreichbaren Empfindlichkeiten für verschiedene Bandbreiten.

Δf [Hz]	i_o [A]	$\Delta E/E$
1.0	$1.75 \cdot 10^{-11}$	$1.4 \cdot 10^{-4}$
0.5	$1.75 \cdot 10^{-11}$	$9.5 \cdot 10^{-5}$
0.1	$1.75 \cdot 10^{-11}$	$4.3 \cdot 10^{-5}$
0.05	$1.75 \cdot 10^{-11}$	$3.0 \cdot 10^{-5}$

Tabelle 1: Δf = Bandbreite, E = Extinktion, i_o = Photokathodenstrom des Photomultipliers

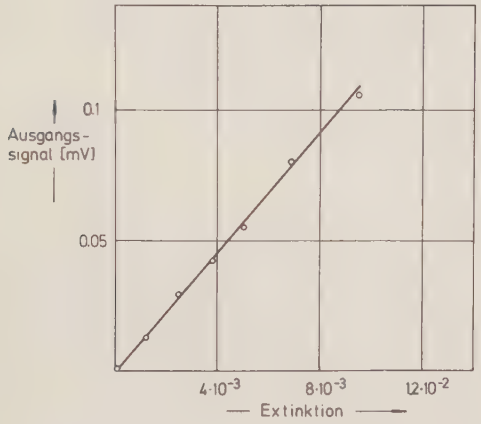
In der Praxis konnten bei einem RC-Wert von 10 sec ohne Schwierigkeiten Empfindlichkeiten von $5 \cdot 10^{-5}$ erreicht werden.

Bei den Messungen an den bimolekularen Membranen machten sich die stets in der Lösung suspendierten Lipidteilchen störend bemerkbar. Die erreichte Messgenauigkeit beträgt hier nur

etwa $2 \cdot 10^{-4}$.

5. Durchführung der Messung und Eichung der Apparatur

Zur Eichung der Apparatur dienten Graufilter und Farbstofflösungen mit bekannter Extinktion. Die Farbstofflösungen wurden mittels einer Mikropipette in die Messzelle eingespritzt. Durch einen Teflonschlauch wurde Argon in die Zelle geblasen, um die Lösung zu durchmischen. Gleichzeitig wurde die Aenderung des Messignales beobachtet. Als Farbstoffe verwendeten wir gerade die uns interessierenden Substanzen Chlorophyll-a, Cytochrom-c und β-Carotin. Die Figur 11 zeigt eine Eichkurve bei 430 nm. Die Kurve verläuft linear. Bei den eigentlichen Messungen genügte es daher, das Messignal von Zeit zu Zeit mit einem Extinktionsnormal zu eichen. Dieses bestand aus einem Glasplättchen, das um 10 Grad gekippt wurde. Die mit der Kippung um 10 Grad verbundene Extinktionsänderung war vorher durch Vergleich mit der Eichkurve (Figur 11) zu $E = 2.80 \cdot 10^{-3}$ bestimmt worden. Vor jeder Messung wurde die Apparatur auf Null abgeglichen. Dann wurde die Probe in den Strahlengang gebracht und das Ausgangssignal registriert.



Figur 11: Ausgangssignal des Differentialphotometers als Funktion der Extinktion der Probe (Chlorophyll-a in Nonan)

C. Trog zum Aufziehen von monomolekularen Schichten auf Glasplättchen nach der Langmuir-Blodgett-Methode[18]

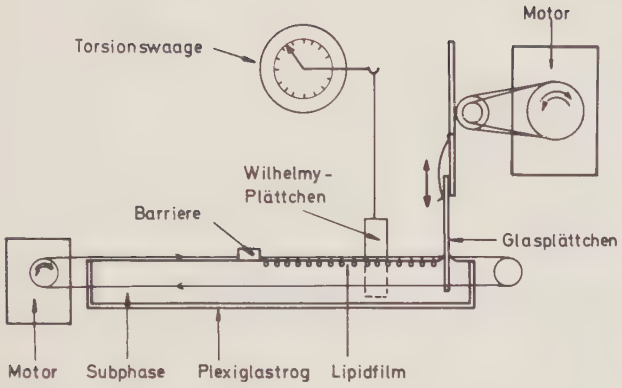
Die Apparatur bestand aus einem Plexiglastrog (25 cm · 35 cm · 5 cm). Dieser wurde bis an den Rand mit der wässrigen Subphase aufgefüllt. Auf dem Rand des Troges glitt eine Barriere. Diese konnte mittels eines Motors mit variabler Geschwindigkeit verschoben werden. Der Filmdruck wurde nach der Wilhelmy-Methode[19] bestimmt. Dazu wurde die Oberflächenspannung mit einer Torsionswaage vor und nach dem Spreiten des Filmes gemessen. Die Differenz der gemessenen Kräfte ist dem Oberflächendruck direkt proportional; wenn das Wilhelmyplättchen (Filtrierpapier) bei beiden Messungen gleich tief in der Subphase steckt und sich der Benetzungswinkel α ($\alpha \simeq 0$ bei Verwendung von Filterpapier) nicht ändert, ergibt sich die Proportionalitätskonstante direkt aus der Dimension des Wilhelmyplättchens.

$$(11) \qquad \pi = \Delta\gamma = \frac{\Delta K}{2(d + b)}$$

π = Filmdruck
$\Delta\gamma$ = Differenz der Oberflächenspannung vor und nach dem Spreiten des Filmes
ΔK = Kraft auf das Wilhelmy-Plättchen
d = Dicke des Plättchens
b = Breite des Plättchens

Der gewünschte Filmdruck konnte mittels der motorbetriebenen Barriere eingestellt werden und an der Wilhelmy-Waage abgelesen werden. Eine Druckabnahme infolge Filmverlustes beim Aufziehen der Schichten konnte jeweils an der Waage verfolgt und durch Verschieben der Barriere korrigiert werden.

Die gereinigten Glasplättchen wurden senkrecht zur Subphasenoberfläche in diese ein- und ausgetaucht. Um ein gleichmässiges Ein- und Austauchen zu gewährleisten, wurde die Eintauchvorrichtung mit einem Motor betrieben. Die ganze Anordnung ist in Figur 12 dargestellt.



Figur 12: Trog zum Aufziehen von monomolekularen Schichten auf Glasplättchen: Der Filmdruck wird durch eine motorbetriebene Barriere eingestellt und mit einer Wilhelmywaage gemessen.

MESSUNGEN UND MESSRESULTATE

Ausgangsmaterial

Für sämtliche Membranversuche wurde bidestilliertes Wasser verwendet. Die Membranen wurden in der Regel in einer 0.1 M KCl-Lösung hergestellt.

Dioleoyllecithin wurde nach der Methode von Robles[20] durch Acylierung von Glycerylphosphorylcholin hergestellt. Phosphatidylinositol wurde nach der Methode von Trevelyan[21] aus Hefe isoliert. Dieses Präparat wurde zur Herstellung der monomolekularen Schichten verwendet. Für die Versuche mit bimolekularen Membranen verwendeten wir ein käufliches Produkt (Koch-Light). Die Lipide wurden unter einer Argonatmosphäre bei -22 Grad aufbewahrt. Die Reinheit der Lipide wurde durch Dünnschichtchromatographie geprüft.

Nonan und Dekan wurden vor Gebrauch zweimal destilliert. Der Reinheitsgrad wurde gaschromatographisch geprüft und war jeweils grösser als 99.5 %.

Chlorophyll-a (von Fluka) sowie Vitamin-K_1 und β-Carotin wurden ohne weitere Reinigung verwendet.

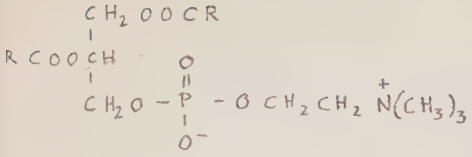
Cytochrom-c (horse heart, Type III) wurde bei der Firma Sigma gekauft. Da Präparate von Cytochrom-c gelegentlich grössere Mengen von Polymeren enthalten, wurde das käufliche Produkt durch Gelfiltration (Sephadex G 75) auf Polymere untersucht.[22,23,24] Dabei wurde festgestellt, dass der Anteil an Polymeren kleiner als 1 % war. Das Präparat wurde deshalb ohne weitere Reinigung verwendet.

A. Pigmenthaltige Dioleoyllecithinmembranen

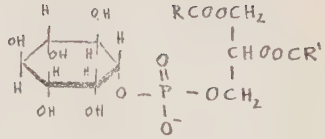
1. Methode

Sämtliche Absorptionsmessungen an den bimolekularen Membranen wurden mit dem auf Seite 12 beschriebenen Differentialphotometer durchgeführt.

Die membranbildende Lösung wurde folgendermassen hergestellt:

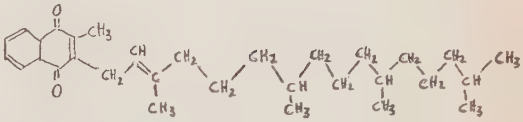


Phosphatidylcholin (Lecithin)

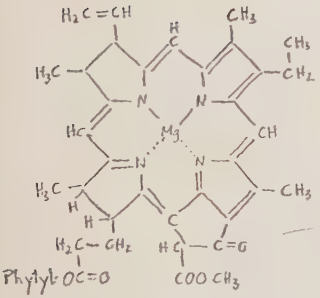


Phosphatidylinositol

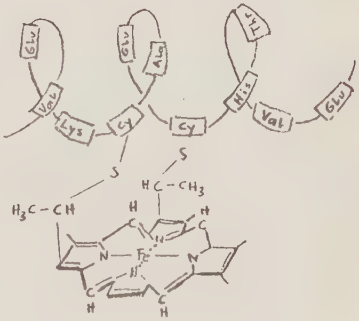
β -Carotin



Vitamin-K_1



Chlorophyll-a



Cytochrom-c

Die Hämgruppe ist tief in den Proteinketten verborgen.

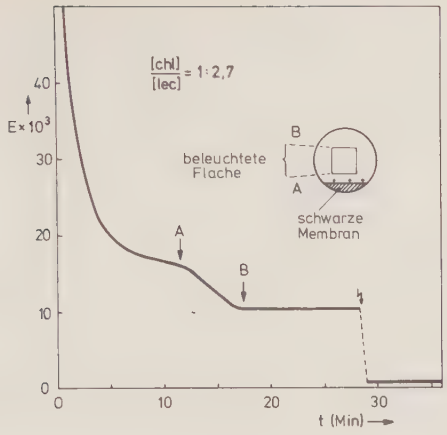
Figur 13: Strukturformeln von einigen verwendeten Substanzen

Ein bestimmtes Volumen der einprozentigen Vorratslösung von Dioleoyllecithin in Aethanol wurde mit derselben Menge Dekan (oder Nonan) und der gewünschten Volumenmenge des in einem leichtflüchtigen Lösungsmittel gelösten Pigmentes gemischt. Am Rotationsverdampfer wurden dann die nichtflüchtigen Lösungsmittel abgedampft. Die Dekanlösung wurde dann mit einem Teflonschlauch über das Loch in dem Teflonhalter geschmiert[25]. Dabei bildete sich zunächst eine dicke Lamelle, die dann allmählich in einen optisch "schwarzen" (d. h. kaum noch reflektierenden) Film überging. Das Küvettengehäuse des Photometers war so konstruiert, dass die Membran im reflektierten Licht mittels eines Fernrohrs beobachtet werden konnte. Dazu musste die Messung unterbrochen werden und die Seitenklappen am Küvettengehäuse geöffnet werden. Im Fernrohr konnte dann die Abnahme der Membrandicke am Auftreten von Interferenzfarben und von "schwarzen" Stellen festgestellt werden.

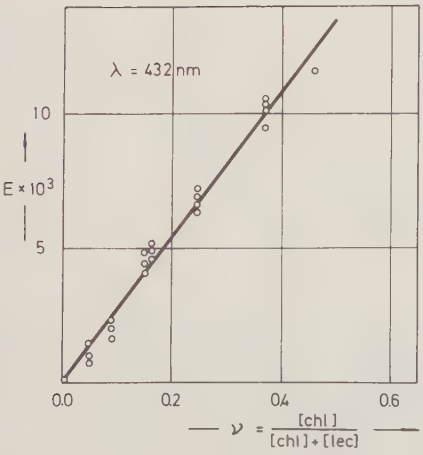
Um die Endabsorption der "schwarzen" Membran zu erhalten, wurde die Membran durch einen Spannungsstoss zerstört. Der Signalsprung ergab dann ein genaues Mass für die Absorption. Diese Methode erlaubte es, Fehler infolge einer leichten Drift der Apparatur zu vermeiden. Nach der Zerstörung der Membran war das Messignal während jeweils etwa 30 Sekunden unruhig, was auf die im Bereich des Messstrahles umherschwimmenden Membranteile zurückzuführen war. Diese sammelten sich aber rasch in der Wasseroberfläche an, so dass die Nullinie ohne Schwierigkeiten ermittelt werden konnte. Die Reflexion einer "schwarzen" Membran ist von der Grössenordnung $6 \cdot 10^{-5}$, täuscht also eine Absorption von weniger als 10^{-4} [26] vor. Die Reflexion konnte daher bei allen Messungen vernachlässigt werden.

2. Chlorophyll-a-haltige Dioleoyllecithinmembranen

Bei Zusatz von Chlorophyll-a zu der Dioleoyllecithinlösung bis zu einem Lecithin-Chlorophyll-Verhältnis von etwa 2:1 wurden die Membranen merklich stabiler als reine Dioleoyllecithinmembranen. Im "schwarzen" Zustand waren die Membranen bis zu drei Stunden stabil. Mit Nonan als Lösungsmittel wurden die Membranen in etwa 20 Minuten schwarz, mit Dekan als Lösungsmittel wurde der "schwarze" Zustand erst nach etwa 40 Minuten er-



Figur 14: Extinktion einer chlorophyll-a-haltigen Dioleoyllecithinmembran bei 432 nm als Funktion der Zeit t. Die Membran wurde zur Zeit t = 0 gebildet. Von A bis B breitet sich der "schwarze" Zustand über die vom Messstrahl ausgeleuchtete Fläche aus. Am Ende des Versuchs wurde die Membran durch einen elektrischen Impuls zerstört (↯). Die membranbildende Lösung enthielt 6.5 µmol Dioleoyllecithin pro ml Nonan.



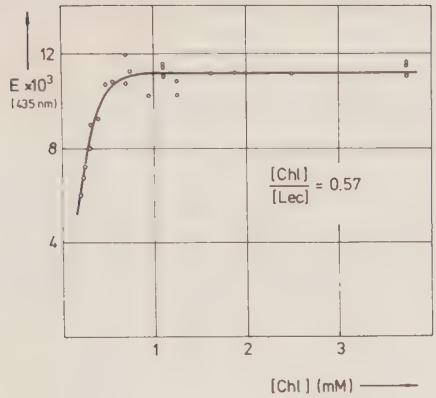
Figur 15:
Absorption der "schwarzen" Membran als Funktion der Zusammensetzung der membranbildenden Lösung. Jeder Punkt entspricht einer verschiedenen Membran. Die Absorption ist unabhängig davon, ob Nonan oder Dekan als Lösungsmittel verwendet wird. Bei $\nu > 0.5$ sind die Membranen instabil.

reicht. Doch waren die mit Dekan gebildeten Membranen etwas stabiler als die mit Nonan gebildeten. Die Endabsorption war unabhängig vom verwendeten Lösungsmittel. Die chlorophyllhaltigen Membranen wurden jeweils regelmässig von unten nach oben fortschreitend schwarz. Figur 14 zeigt die Aenderung der Extinktion (Absorption plus Reflexion) einer chlorophyllhaltigen Membran als Funktion der Zeit. Die Extinktion nimmt zunächst rasch ab und geht dann in ein annähernd konstantes Stadium über. In diesem Zustand zeigt die Membran starke Interferenzfarben. Sobald die schwarze Fläche in den Bereich des Messstrahles kommt (vgl. Figur 14, Punkt A), nimmt die Extinktion wieder stark ab, bis sich die "schwarze" Membran über die ganze vom Messstrahl ausgeleuchtete Fläche ausgebreitet hat (Punkt B). Dann bleibt die Absorption während der Lebensdauer der Membran (bis 3 Stunden) konstant.

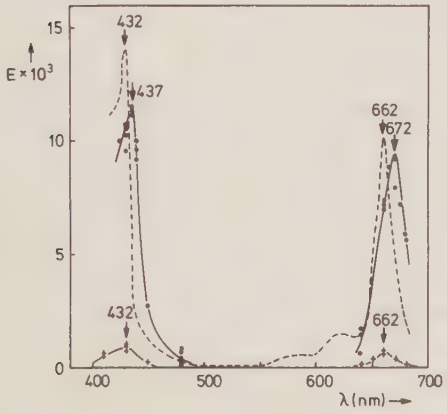
Zur Untersuchung der Chlorophyllkonzentration in der "schwarzen" Membran wurde in einer ersten Messreihe das Verhältnis von Nonan zu Lecithin konstant gehalten und die Chlorophyllkonzentration in der Lösung variiert. In einer zweiten Messreihe wurde das Verhältnis von Chlorophyll zu Lecithin konstant gehalten, während die Chlorophyllkonzentration geändert wurde. Die Ergebnisse sind in den Figuren 15 und 16 dargestellt. Dieselben Versuche mit Dekan als Lösungsmittel brachten dieselben Ergebnisse.

Mit dem verwendeten Spektralphotometer war es nicht möglich, das Absorptionsspektrum an einer einzigen Membran zu messen. Wollte man dies erreichen, so müssten sich sämtliche zum Abgleich dienenden Einrichtungen so präzis einstellen lassen, dass es genügte, diese auf vorgegebene Positionen einzustellen, um die Apparatur auf Null abzugleichen. Dies kann aber bei Absorptionsmessungen der Grössenordnung 10^{-3} bis 10^{-4} nur mit grossem mechanischem Aufwand erreicht werden, deshalb musste darauf verzichtet werden.

Die gute Reproduzierbarkeit der Einzelmessungen erlaubte aber eine Konstruktion des Absorptionsspektrums aus Messungen an verschiedenen Membranen. Figur 17 zeigt das Spektrum von chlorophyll-a-haltigen Dioleoyllecithinmembranen im Bereich der Soretbande (430 nm) und des Rotpeaks. Das Spektrum wurde für zwei



Figur 16: Absorption der "schwarzen" Membran als Funktion der Chlorophyllkonzentration in der membranbildenden Lösung bei konstantem Chlorophyll-Lecithin-Verhältnis.



Figur 17: Absorptionsspektrum von chlorophyll-a-haltigen "schwarzen" Membranen. Das Spektrum wurde aus Messungen an verschiedenen Membranen (jeweils ein Punkt) konstruiert.

$1.1 \cdot 10^{-7}$M Chlorophyll-a in n-Nonan

• • • "schwarze" Membranen $= \frac{[Chl]}{[Chl] + [Lec]} = 0.37$

+ + + "schwarze" Membranen $= \frac{[Chl]}{[Chl] + [Lec]} = 0.050$

verschiedene Werte des Verhältnisses

$$\nu \equiv \frac{[Ch]}{[Ch] + [Led]}$$

aufgenommen, nämlich für $\nu = 0.37$ und $\nu = 0.05$. Zum Vergleich wurde das Lösungsspektrum von Chlorophyll-a in Nonan im gleichen Spektralphotometer aufgenommen. Bei $\nu = 0.37$ ist das Absorptionsspektrum gegenüber dem Lösungsspektrum nach längeren Wellenlängen verschoben (vgl. Tabelle 2). Der Rotpeak ist zudem deutlich verbreitert.

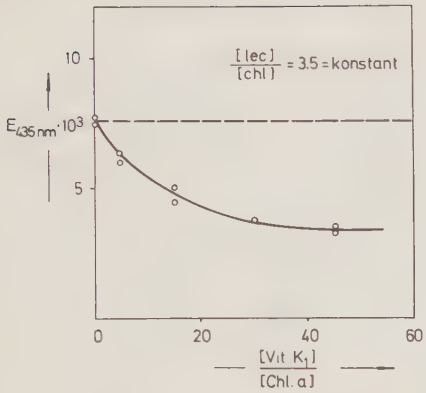
3. Versuche mit Vitamin-K_1

Vitamin-K_1 besitzt eine starke Absorptionsbande im nahen UV. Im sichtbaren Bereich absorbiert es dagegen nur schwach. Da unser Spektralphotometer aber nur Messungen im sichtbaren Bereich ermöglichte, konnte das in Membranen eingebaute Vitamin-K_1 nicht direkt nachgewiesen werden. Da Vitamin-K_1 in den chlorophyllhaltigen Thylakoiden vorkommt[27], war es interessant zu untersuchen, welchen Einfluss Vitamin-K_1 auf die Absorption einer chlorophyllhaltigen Membran ausübt.

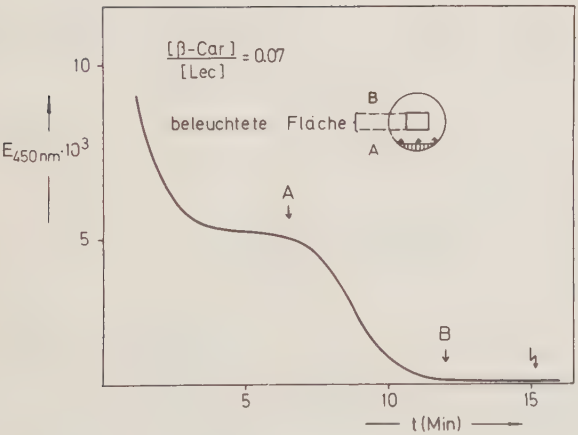
Vitamin-K_1 besitzt wie Chlorophyll und Lecithin amphiphilen Charakter. Es war deshalb anzunehmen, dass bei Zusatz von Vitamin-K_1 zu einer Lösung mit konstantem Chlorophyll-Lecithin-Nonan-Verhältnis Chlorophyll aus der Grenzfläche der Membran verdrängt wird. Tatsächlich konnte bei solchen Versuchen eine Abnahme der Absorption im Bereiche der Soretbande (430 nm) von Chlorophyll-a festgestellt werden (vgl. Figur 18).

4. Versuche mit β-Carotin

Es wurde eine mit β-Carotin gesättigte Dioleoyllecithinlösung in Dekan hergestellt. Die β-Carotinkonzentration war etwa 10^{-3} m. Die mit dieser Lösung hergestellten Membranen waren bis zu einer Stunde stabil. Sie waren nach etwa 15 Minuten schwarz. Die Absorption wurde bei 450 nm gemessen. Bei allen Versuchen konnte keine messbare Endabsorption festgestellt werden, d. h. die Absorption der schwarzen Membran war kleiner als $E = 2 \cdot 10^{-4}$.



Figur 18:
Absorption einer chlorophyll-a und vitamin-K_1-haltigen "schwarzen" Membran bei verschiedenem Vitamin-K_1-Chlorophyll-a-Verhältnis in der membranbildenden Lösung; jeder Punkt entspricht einer verschiedenen Membran.



Figur 19: Extinktion (Absorption plus Reflexion) einer β-carotinhaltigen Dioleoyllecithinmembran bei 450 nm als Funktion der Zeit t. Die Membran wurde zur Zeit t = 0 gebildet. Von A bis B breitet sich der "schwarze" Bezirk über die ganze vom Messstrahl ausgeleuchtete Fläche aus.

Figur 19 zeigt die Extinktion einer β-carotinhaltigen Membran als Funktion der Zeit.

5. Diskussion

Die Zusammensetzung bimolekularer Lipidmembranen war bisher weitgehend unbekannt. Messungen des Reflexionskoeffizienten und der elektrischen Kapazität sowie Elektronenmikroskopaufnahmen ergaben eine Membrandicke,[25,28,29,30] die gerade etwa der doppelten Länge der membranbildenden Lecithinmoleküle entspricht. Daher schliesst man auf eine Figur 1 b. entsprechende Struktur. Durch Traceruntersuchungen[31] wurde versucht, näheren Aufschluss über die Zusammensetzung von solchen Membranen zu erhalten. Die angewandte Methode stellt aber einen drastischen Eingriff in das molekulare System dar und liefert deshalb nur ungenaue Resultate.

Die vorliegenden Messungen an den chlorophyllhaltigen Membranen erlauben es, ohne wesentliche Eingriffe in das System, die Konzentration einer Komponente (Chlorophyll) einer bimolekularen Membran zu bestimmen. Für kleine Absorptionen gilt:

$$\frac{\Delta I}{I_o} \simeq \ln \frac{I_o}{I} = n\,\sigma \qquad (12)$$

σ = Absorptionsquerschnitt

und mit

$$\ln \frac{I_o}{I} = 2.30 \cdot E \qquad (13)$$

wird

$$n = 2.30 \cdot \frac{E}{\sigma} \qquad (14)$$

n = Anzahl Chlorophyll-a-Moleküle pro cm^2

Da sich das Spektrum von den in die bimolekularen Membranen eingebauten Chlorophyll-a-molekülen nicht sehr stark vom Chlorophyll-Lösungsspektrum unterscheidet, setzen wir näherungsweise $\sigma_{\text{Lösung}} = \sigma_{\text{Membran}}$. $\sigma_{\text{Lösung}}$ für Chlorophyll-a ist

4.8 $Å^2$ am Maximum der Soretbande (vgl. Seite 3).

Eine weitere Ungenauigkeit in der Berechnung von n rührt von der Ungewissheit her, ob die Chlorophyllmoleküle in der Membran eine Vorzugsrichtung besitzen. Nimmt man an, dass das Uebergangsmoment isotrop im Porphyrinring[32] liegt, so kann man zeigen, dass die Extremwerte der Extinktionskoeffizienten von Chlorophyllmolekülen $\varepsilon_\perp = \frac{3}{4}\varepsilon$ und $\varepsilon_\parallel = \frac{3}{2}\varepsilon$ sind ($\varepsilon_\perp, \varepsilon_\parallel$ = Extinktionskoeffizienten für senkrechte und parallele Orientierung der Porphyrinringe relativ zur Membranebene, ε = Extinktionskoeffizient für statistische Orientierung). Die wirkliche Anzahl der Chlorophyll-a-Moleküle pro cm^2 kann deshalb um einen Faktor 2/3 kleiner oder um einen Faktor 4/3 grösser sein als die aus ε berechnete Anzahl.

Der amphiphile Charakter der Chlorophyll-a-Moleküle macht es wahrscheinlich, dass diese Moleküle in den beiden Grenzflächen der Membran lokalisiert sind. Unter dieser Annahme lässt sich dann aus den Daten der Figur 15 der mittlere Abstand a der Chlorophyllmoleküle berechnen (vgl. Tabelle 2). Dass sich die Chlorophyllmoleküle in den Grenzflächen festsetzen, geht auch aus Fluoreszenzmessungen hervor.[33] Setzt man eine Grenzfläche einer Membran einer Peroxidisulfatlösung aus, so werden die Chlorophyllmoleküle in dieser Schicht zerstört und die Intensität des Fluoreszenzlichtes fällt auf die Hälfte ab. Lässt man dann die Peroxidisulfatlösung auch auf die zweite Grenzfläche einwirken, so wird keine Fluoreszenz mehr gemessen.

ν	E	Anzahl Chlorophyllmoleküle pro cm^2 Membranfläche bei statistischer Orientierung	mittlerer Abstand der Chlorophyllmoleküle in einer Membrangrenzfläche bei statistischer Orientierung
0.04	$1.1 \cdot 10^{-3}$	$0.53 \cdot 10^{13}$ cm^{-2}	67.0 Å
0.40	$10.8 \cdot 10^{-3}$	$5.2 \cdot 10^{13}$ cm^{-2}	21.4 Å

Tabelle 2

Es ist interessant festzustellen, dass die Lösungsmittelmenge (Nonan oder Dekan) in der membranbildenden Lösung um

einen Faktor 10 variiert werden kann, ohne dass sich die Absorption der Membran ändert. In der "schwarzen" Membran ist die Chlorophyll-a-Konzentration wesentlich grösser als in der membranbildenden Lösung. So ergibt beispielsweise eine Chlorophyllkonzentration von $4.4 \cdot 10^{-4}$ M in der Ausgangslösung eine über die Membrandicke d gemittelte Chlorophyllkonzentration von 3 M; hierbei wurde für die Dicke d der aus Kapazitätsmessungen an chlorophyllhaltigen Membranen ermittelte Wert $d \simeq 70$ Å verwendet.[33]

Bei hohen Chlorophyll-a-Konzentrationen in der Membran tritt eine Rotverschiebung des Chlorophyllspektrums ein. Aehnliche Effekte sind einerseits aus Untersuchungen an Chloroplasten,[34] andererseits aus Experimenten mit Chlorophyll-a-Monoschichten an Wasser-Luft-Grenzflächen bekannt.[35] Für die Rotverschiebung kann ein Lösungsmitteleffekt ausgeschlossen werden, da bei kleinen Chlorophyllkonzentrationen keine Verschiebung auftritt. Der Effekt dürfte auf eine Chromophorenwechselwirkung zurückzuführen sein. Genauere Aussagen über diese Wechselwirkung sind aber nur möglich, wenn die Orientierung der Moleküle bekannt ist.

B. Wechselwirkung zwischen Phosphatidylinositol und Cytochrom-c

Zum Studium der Wechselwirkung von oxidiertem Cytochrom-c mit Phosphatidylinositol (PI) wurden zwei verschiedene Modellsysteme verwendet:

1. Monomolekulare Schichten, die nach der Methode von Langmuir-Blodgett auf Glasplättchen aufgezogen wurden
2. Bimolekulare Membranen in wässriger Phase

Abkürzung: PI = Phosphatidylinositol

I. Adsorption von Cytochrom-c an bimolekulare Lipidmembranen

Phosphatidylinositolmembranen und Dioleoyllecithinmembranen wurden nach der auf Seite 26 beschriebenen Methode hergestellt. Dazu wurde eine 0.5 prozentige Lösung von PI oder Dioleoyllecithin in Dekan verwendet. Die Messungen wurden in dem früher beschriebenen Differentialphotometer durchgeführt. Die Messküvette wurde mit einer wässrigen Lösung von KCl und Cytochrom-c gefüllt. Der pH der Lösung wurde mit NaOH auf einen Wert von 7.5 bis 8.0 eingestellt und vor und nach der Messung kontrolliert. PI ist bei diesem pH-Wert negativ, Cytochrom-c positiv geladen. Es ist also zu erwarten, dass Cytochrom-c an die bimolekulare PI-Membran adsorbiert wird, sofern die geladenen Gruppen des Lipides mit der wässrigen Lösung in Kontakt stehen, was aus energetischen Gründen zu erwarten ist.

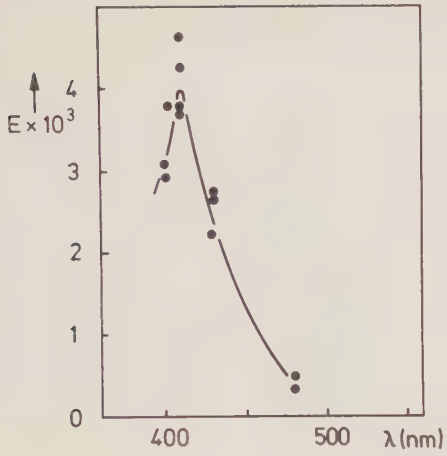
Tatsächlich findet man, dass bei niedriger Ionenstärke Cytochrom-c an eine "schwarze" Membran gebunden wird. Figur 20 zeigt das Spektrum der "schwarzen" Membran mit adsorbiertem Cytochrom-c. Im Soretpeak (410 nm) ergibt sich aus Messungen an 10 verschiedenen Membranen eine mittlere Extinktion von $E = (4.0 \pm 0.2) \cdot 10^{-3}$. Das Spektrum ist wieder Punkt für Punkt durch Messung an einzelnen Membranen erhalten worden. Durch Kapazitätsmessungen wurde die Dicke dieser Membranen zu 50 Å bis 100 Å bestimmt. Die Reflexion des Filmes kann deshalb auch bei diesen Versuchen vernachlässigt werden.

E/2 ergibt die Anzahl der Cytochrom-c-Moleküle pro cm^2, die an jede Seite der Membran gebunden werden. Mit $\varepsilon_{410} = 106\,100\ cm^2 M^{-1}$ [8] ergibt sich für n ein Wert von

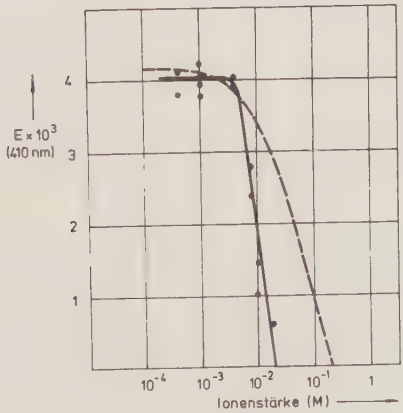
$n = 1.1 \cdot 10^{13} cm^{-2}$. Cytochrom-c ist annähernd eine Kugel vom Durchmesser 31 Å [36]; bei dichtester Packung beträgt die Molekülzahl in einer monomolekularen Schicht $1.2 \cdot 10^{13}$ cm^{-2}. Der experimentell bestimmte Wert kommt somit bis auf etwa 10 % an diesen Grenzwert heran. Da beim Cytochrom-c wie beim Chlorophyll der Porphyrinring für die Absorption verantwortlich ist, gelten hier die gleichen Abschätzungen wie auf Seite 33. Die Anzahl der gebundenen Moleküle kann also um einen Faktor 2/3 kleiner oder um einen Faktor 4/3 grösser sein, als der aus dem für rein statistische Orientierung geltenden ε berechnete Wert. Die Tatsache, dass die Gesamtabsorption gerade etwa der Absorption zweier monomolekularer Schichten entspricht, lässt vermuten, dass sich eine dem Davson-Danielli-Modell entsprechende Struktur bildet (vgl. Figur 1 b).

Experimente unter den gleichen Bedingungen ($5 \cdot 10^{-7}$ M Cytochrom-c + 10^{-3} KCl, pH ~7.8) mit einer Dioleoyllecithinmembran ergaben bei 410 nm eine Absorption kleiner als $2 \cdot 10^{-4}$. Dies bedeutet, dass mindestens 20 mal weniger Cytochrom-c an die ungeladene Lecithinmembran gebunden wird als an die negativ geladene PI-Membran.

Der Einfluss der Ionenstärke auf die Cytochrom-c-Adsorption geht aus Figur 21 hervor. Es wurden Membranen in Lösungen mit unterschiedlicher KCl-Konzentration hergestellt. Die Cytochromkonzentration ($5 \cdot 10^{-7}$M) und der pH-Wert (7.8) waren bei allen Versuchen gleich gross.



Figur 20: Spektrum einer "schwarzen" Phosphatidylinositolmembran mit adsorbiertem Cytochrom-c. Die Membranen wurden in $5 \cdot 10^{-7}$ M Cytochrom-c + 10^{-3} M KCl-Lösung (pH 7.8) gebildet. Jeder Punkt entspricht der Messung an einer verschiedenen Membran.



Figur 21: Adsorption von Cytochrom-c an eine Phosphatidylinositolmembran als Funktion der Ionenstärke (wässrige Phase: $6 \cdot 10^{-7}$ M Cytochrom-c + verschiedene Mengen von KCl; pH 7.6). Gestrichelte Linie: Adsorption an zwei Phosphatidylinositol-Monoschichten.

II. Adsorption von Cytochrom-c an monomolekulare Phosphatidylinositol-Schichten

1. Prinzip

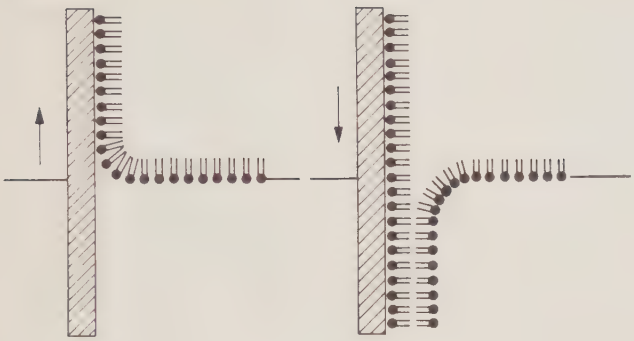
Nach der Methode von Langmuir-Blodgett[18] wurden monomolekulare Lipidschichten von einer Wasseroberfläche auf ein Glasplättchen übertragen. Dazu wurde zunächst auf der Wasseroberfläche ein Lipidfilm gespreitet. Der Oberflächendruck des Filmes wurde durch eine Barriere konstant gehalten. Durch Ein- und Austauchen von Glasplättchen wurde dann der Oberflächenfilm auf Glasplättchen übertragen. Die so vorbereiteten Plättchen wurden dann in eine Cytochrom-c-Lösung gesteckt und die Adsorption von Cytochrom-c spektralphotometrisch verfolgt.

2. Herstellung der Schichten

Damit der Oberflächenfilm gut auf die Glasoberfläche aufgezogen werden konnte und sich homogene Schichten bildeten, mussten die Subphase und die Glasplättchen sehr sauber sein. Für unsere Versuche verwendeten wir in einer Quarzapparatur tridestilliertes Wasser. Die Glasplättchen (OS, Hellma 23 mm x 55 mm x 1.25 mm) wurden mit Perlfit (Minatolwerke AG, Luzern) gereinigt und anschliessend mit tridestilliertem Wasser und Methanol gespült.

a. Stearatschichten

Eine benzolische Lösung von Stearinsäure ($3 \cdot 10^{-3}$M) wurde auf der Subphase gespreitet. Diese bestand aus einer wässrigen Lösung von 0.03 mM $BaCl_2$ und 0.4 mM $KHCO_3$, pH 7.4. Der Filmdruck wurde während des Aufziehens der Schicht bei 17.0 ± 0.5 dyn/cm konstant gehalten. Die Aufziehgeschwindigkeit war für die erste Stearatschicht (erstmaliges Herausziehen) 1.1 cm/Min., für die weiteren Schichten 2.6 cm/Min.. Nachdem die erste Schicht aufgezogen war, wurde bei jedem Ein- und Austauchen eine weitere Schicht aufgezogen. Nachdem die Glasoberfläche mit einer ungeraden Anzahl Schichten bedeckt war, war die Oberfläche jeweils hydrophob, da die Kohlenwasserstoffgruppen der letzten Schicht nach aussen gerichtet waren.[37,38]



Figur 22: Aufziehen von Langmuir-Blodgett-Schichten auf Glasplättchen: eine ungerade Anzahl Schichten ergibt jeweils eine hydrophobe Oberfläche.

b. Phosphatidylinositolschichten

Auf eine hydrophobe Unterlage von Stearatschichten konnte eine PI-Schicht aufgezogen werden. Gewöhnlich wurden fünf Stearatschichten als Unterlage genommen.

Zur Herstellung der PI-Schichten wurde dieselbe Subphase verwendet wie für Stearatschichten. PI wurde durch Auftropfen einer Methanol-Chloroform-Lösung (Methanol : Chloroform = 1 : 10) gespreitet. Der Film wurde unter einem Druck von 10.0 ± 0.5 dyn/cm konstant gehalten. Beim erstmaligen Eintauchen eines hydrophoben Glasplättchens wurde eine PI-Schicht aufgezogen. Beim weiteren Aus- und Eintauchen wurden keine weiteren Schichten aufgezogen. Die PI-Schicht wurde mit einer Geschwindigkeit von 2.6 cm/Min. übertragen. Sämtliche Versuche wurden bei Zimmertemparatur durchgeführt.

3. Messungen

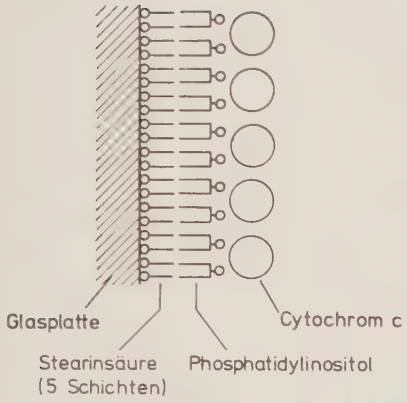
Das mit fünf Stearatschichten und einer PI-Schicht bedeckte Glasplättchen wurde dann in die Messküvette des Einstrahlspektrometers gebracht. Als Referenz diente ein leeres Glasplättchen. Zu Beginn der Messung wurde die Küvette mit reiner Pufferlösung gefüllt und die Extinktionsdifferenz der beiden Plättchen gemessen. Daraus ergab sich ein Korrekturfaktor, der die geringfügigen Reflexionsunterschiede berücksichtigte. Die Zelle wurde dann mit gepufferter Cytochrom-c-Lösung gefüllt und nach einer vorgegebenen Zeit wieder mit Pufferlösung mehrmals gespült. Ein Rührer sorgte während des ganzen Vorganges für die Durchmischung der Lösung in der Küvette. Die Extinktion der adsorbierten Cytochrom-c-Schicht (vgl. Figur 23) blieb dann in der reinen Pufferlösung während mindestens einer Stunde konstant.

a. Adsorptionsgeschwindigkeit

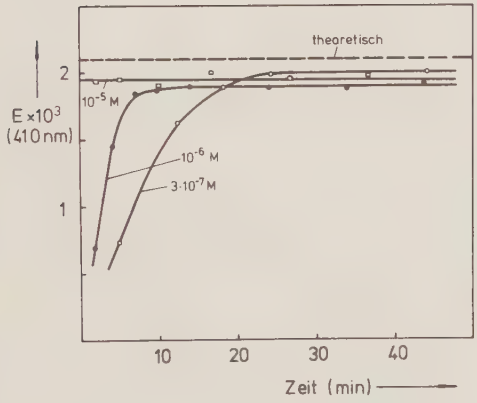
In Figur 24 ist das zeitliche Verhalten der Adsorption von Cytochrom-c für drei verschiedene Cytochrom-c-Konzentrationen dargestellt. Bei einer Proteinkonzentration von $c = 10^{-5}$M wird der Sättigungswert in weniger als zwei Minuten erreicht. Bei den Konzentrationen 10^{-6}M und $3 \cdot 10^{-7}$M wird die halbe Sättigung nach 3 beziehungsweise 8 Minuten erreicht. Alle drei Versuche liefern innerhalb der Fehlergrenzen den gleichen Sättigungswert. Im Soretpeak bei 410 nm ergibt sich aus sieben Versuchen für den Sättigungswert eine mittlere Extinktion von $E = (2.0 \pm 0.1) \cdot 10^{-3}$ pro Schicht. Daraus lässt sich in gleicher Weise wie bei den Membranversuchen (vgl. Seite 35) die Anzahl Cytochrom-c-Moleküle pro cm^2 berechnen. Wir erhalten $n = 1.1 \cdot 10^{13}$ cm^{-2} in Uebereinstimmung mit der Anzahl Moleküle, die an eine Seite einer bimolekularen Membran adsorbiert werden. Für die Fehlerabschätzung gelten dieselben Ueberlegungen wie bei den Membranversuchen.

b. Stabilität der Bindung von Cytochrom-c an Phosphatidylinositol-Schichten

Ist die Wechselwirkung von Cytochrom-c mit Phosphatidylinositol-Monoschichten hauptsächlich elektrostatischer Natur, dann sollte die Bindung bei hoher Ionenstärke unstabil werden.



Figur 23:
Adsorption von Cytochrom-c an eine Phosphatidylinositol-Monoschicht



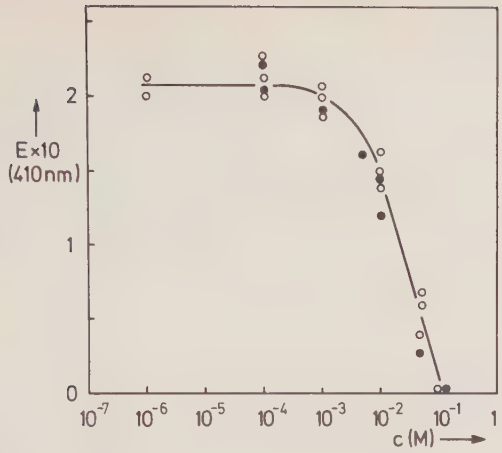
Figur 24: Adsorption von Cytochrom-c an eine Phosphatidylinositol-Monoschicht als Funktion der Zeit t bei drei verschiedenen Proteinkonzentrationen. E bedeutet die Extinktion im Soretpeak (410 nm) für eine einzelne Schicht.

Tatsächlich findet man, dass bei Phosphatpufferkonzentrationen über 0.1 M keine Bindung mehr eintritt. In einer ersten Messreihe wurde die Adsorption aus einer Cytochrom-c-Lösung mit bestimmter Pufferkonzentration untersucht. Nachdem der stationäre Zustand erreicht war, wurde die Extinktion in reiner Pufferlösung von derselben Konzentration gemessen (vgl. Figur 25).

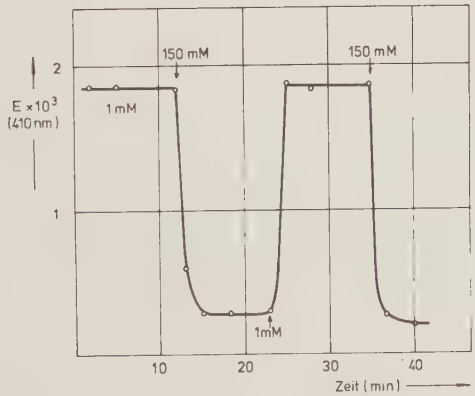
In einer zweiten Messreihe wurde das Protein aus einer Lösung mit kleiner Ionenstärke ($c = 10^{-4}M$) gebunden, so dass die Absorption maximal wurde. Das Plättchen wurde dann in Pufferlösungen mit Konzentrationen $c > 10^{-4}M$ gebracht, worauf ein Teil des Proteins in Lösung ging. Figur 25 zeigt, dass bei gegebener Ionenstärke die Extinktion in beiden Fällen nahezu gleich gross ist. Dies bedeutet, dass die Bindung reversibel ist. Dieselben Resultate erzielt man, wenn man die Ionenstärke statt durch Aenderung der Phosphatpufferkonzentration durch Hinzufügen von KCl einstellt. Dies deutet darauf hin, dass die beschriebenen Effekte unabhängig von der spezifischen Natur des Elektrolyten sind und reine Ionenstärkeeffekte darstellen.

Die Reversibilität der Bindung geht auch aus dem folgenden Experiment hervor (vgl. Figur 26). Cytochrom-c wird zunächst aus einer Pufferlösung der Konzentration $10^{-3}M$ adsorbiert. Dann wird diese gegen eine Pufferlösung der Konzentration 0.15 M ausgetauscht, wobei der grösste Teil des Proteins rasch in Lösung geht. Wird das Plättchen dann von neuem einer Proteinlösung niedriger Ionenstärke ausgesetzt, so nimmt die Extinktion wieder genau den ursprünglichen Wert an. Das bedeutet, dass die PI-Schicht beim Desorptionsprozess nicht zerstört wird. Das Spektrum von Cytochrom-c, das von mehreren Plättchen abgewaschen wurde, zeigt gegenüber dem ursprünglichen Lösungsspektrum von Cytochrom-c keine Veränderungen.

Die Vermutung, dass für die Bindung von Cytochrom-c an eine PI-Schicht vor allem elektrostatische Kräfte verantwortlich sind, wird durch die pH-Abhängigkeit der Bindung bestärkt. Cytochrom-c besitzt unterhalb pH 10.7 [39] eine positive Ueberschussladung, während Phosphatidylinositol für pH-Werte grösser als 3.5 negativ geladen ist. [40] Tatsächlich ergab sich, dass im Bereich von pH 3.5 bis 9.5 die Bindung unabhängig vom pH ist. Bei pH 2.8 konnte jedoch keine Adsorption mehr gemessen werden. Dass die PI-Schicht



Figur 25:
Adsorption von Cytochrom-c an eine Phosphatidyl-Monoschicht als Funktion der Phosphatpufferkonzentration c (pH 7.5). E = Extinktion für eine einzelne Schicht bei 410 nm.
Offene Kreise: Die Adsorption erfolgte in 10^{-5} M Cytochrom-c-Lösung bei der Phosphatpufferkonzentration c. Die Extinktion wurde in Phosphatpuffer von derselben Konzentration gemessen.
Ausgefüllte Kreise: Das Protein wurde aus einer Pufferlösung der Konzentration 10^{-4} M adsorbiert und das Plättchen anschliessend in eine Pufferlösung der Konzentration c gebracht.



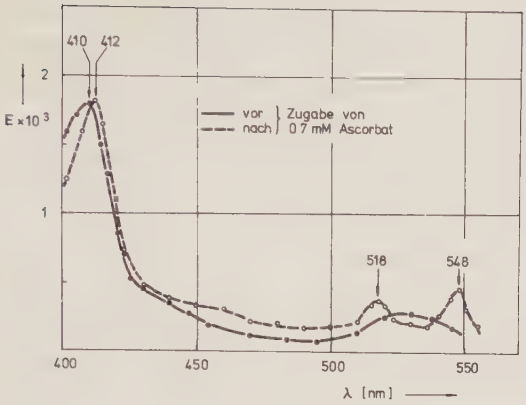
Figur 26:
Reversibilität der Bindung. Zu Beginn ist die Cytochrom-c-Schicht in Kontakt mit einer Pufferlösung der Konzentration 1 mM (pH 7.5). Wird die Pufferkonzentration auf 150 mM erhöht, so geht der grösste Teil des Proteins in Lösung. Wird das Plättchen wieder in Kontakt mit einer Lösung der Cytochrom-c-Konzentration 10^{-5} M und der Pufferkonzentration 1 mM gebracht, so wird der ursprüngliche Zustand wiederhergestellt.

auch bei pH 2.8 stabil ist, konnte dadurch gezeigt werden, dass bei pH-Erhöhung von 2.8 auf 7.0 an dieselbe Schicht wieder Cytochrom-c gebunden wurde. Wird ein Plättchen mit einer vorher adsorbierten Cytochrom-c-Schicht einer wässrigen Lösung vom pH 2.8 ausgesetzt, so geht das Protein langsam in Lösung. Diese Beobachtung ist in Uebereinstimmung mit der Erwartung, dass unterhalb pH 3 der grösste Teil der Phosphatidylinositol-Moleküle in protonierter Form vorliegt.

c. Reduktion von adsorbiertem Cytochrom-c

Adsorbiertes Cytochrom-c kann reduziert und wieder oxidiert werden. Zur Messung des Absorptionsspektrums wurden im Spektrometer fünf Plättchen (mit total 10 Schichten) hintereinandergereiht. Zuerst wurde das Spektrum des oxidierten Proteins gemessen (vgl. Figur 27). Dieses Spektrum ist ununterscheidbar vom Lösungsspektrum. Dies war zu erwarten, da der Porphyrinring im Innern des Proteinmoleküls angeordnet ist und somit gut gegen die Umgebung abgeschirmt ist. Wird das gebundene Ferricytochrom-c in Kontakt mit einer 0.7 mM Ascorbat-Lösung (pH 7.6) gebracht, so beobachtet man eine Rotverschiebung der Soretbande und das Erscheinen von neuen Peaks bei 520 nm und 55 nm. Diese Veränderungen sind charakteristisch für die Bildung von Ferrocytochrom-c. Wird die Ascorbatlösung durch eine luftgesättigte Pufferlösung ersetzt, so wird das Cytochrom-c langsam wieder oxidiert. Nach 4 Stunden war das Spektrum wieder identisch mit dem ursprünglichen Spektrum.

Es ist interessant, dass reduziertes Cytochrom-c in wässriger Lösung nicht mit O_2 reagiert. Autoxidierbarkeit wurde jedoch nach Acetylisierung des Lysylrestes beobachtet.[41]



Figur 27: Spektrum von Cytochrom-c im oxidierten und reduzierten Zustand. Die Reduktion erfolgte durch Zugabe von 0.7 mM Ascorbat zu einer 10 mM Phosphatpufferlösung (pH 7.6). E bedeutet die Extinktion einer einzelnen Cytochrom-c-Schicht.

4. Diskussion

a. Adsorptionsgeschwindigkeit

Eine obere Grenze für die Geschwindigkeit der Bindung wird durch die Kinetik einer diffusionskontrollierten Adsorption gegeben. Die Adsorptionsgeschwindigkeit ist dann maximal, wenn jedes Proteinmolekül, das auf die Oberfläche trifft, gebunden wird. In diesem Grenzfall kann der zeitliche Verlauf der Adsorption durch Lösen der Diffusionsgleichung unter den gegebenen Randbedingungen berechnet werden. Ist N(t) die Anzahl der gebundenen Proteinmoleküle pro cm^2 als Funktion der Zeit t, n_o die Anzahl der Proteinmoleküle pro cm^3 in der Lösung und D der Diffusionskoeffizient des Proteins, dann gilt die folgende Beziehung:[42]

$$N(t) = 2\, n_o \sqrt{\frac{Dt}{\pi}} \qquad (15)$$

Diese Gleichung gilt für kleine Zeiten, solange die von Protein

bedeckte Fläche klein ist gegen die Gesamtfläche. In der Herleitung von Gleichung (15) ist der Einfluss des elektrischen Feldes auf die Diffusionsgeschwindigkeit nicht berücksichtigt. Dies würde jedoch nur zu einer kleinen Korrektur führen, die vernachlässigt werden kann. Aus Gleichung (15) können wir dann zum Beispiel die Zeit τ berechnen, bei der gerade $N = N(\infty)/3$ ist, wobei wir $N(\infty) = 10^{13}\text{cm}^{-2}$ setzen. Mit $D = 0.95 \cdot 10^{-6}\text{cm}^2\text{s}^{-1}$ [43] erhalten wir für die drei Konzentrationen $c_1 = 10^{-5}\text{M}$, $c_2 = 10^{-6}\text{M}$, $c_3 = 3 \cdot 10^{-7}\text{M}$ der Figur 27 die Zeiten: $\tau_1 = 0.25$ s, $\tau_2 = 25$ s, $\tau_3 = 280$ s. Experimentell finden wir $\tau_1 < 100$ s, $\tau_2 \simeq 110$ s, $\tau_3 \simeq 380$ s. Die gemessenen Zeiten stimmen also in der Grössenordnung mit der minimalen Zeit überein, die für eine diffusionskontrollierte Adsorption benötigt wird. Das bedeutet aber, dass beinahe jedes Cytochrom-c-Molekül, das auf die Oberfläche auftrifft, gebunden wird. Ein solches Verhalten ist immer dann zu erwarten, wenn eine rein elektrostatische Wechselwirkung vorliegt.

Aus der raschen Desorption nach der Erhöhung der Ionenstärke schliesst man, dass keine wesentliche Penetration des Cytochrom-c in die Lipidschicht erfolgt. Hingegen wurde eine Penetration von Cytochrom-c in eine Lipidmonoschicht an der Grenzfläche Wasser-Luft beobachtet.[44,45]

b. Bindung als Funktion der Ionenstärke

Die beschriebenen Experimente haben gezeigt, dass das gebundene Cytochrom-c nicht durch Spülen mit einer reinen Pufferlösung kleiner Ionenstärke ($\leq 10^{-3}\text{M}$) von der Lipidschicht abgelöst wird. Andererseits zeigt die rasche Desorption in konzentrierterer Salzlösung, dass die Bindung reversibel ist. Wir müssen deshalb annehmen, dass stets ein Gleichgewicht zwischen gebundenem und gelöstem Cytochrom-c vorliegt, dass aber die Gleichgewichtskonzentration c bei kleiner Ionenstärke extrem niedrig ist.

Die Desorptionsgeschwindigkeit wird durch die Diffusion des Proteins durch die konvektionsfreie Schicht an der Oberfläche bestimmt. Die Dicke δ dieser Schicht ist von der Grössenordnung $\delta \simeq 10^{-3}\text{cm}$. Ist die Gleichgewichtskonzentration an der Oberfläche z. B. kleiner als $c = 10^{-12}\text{M}$, dann wird der Fluss $\Phi = cD/\delta \simeq 10^{-18}\text{Mol/cm}^2\text{s}$ (bei einem Diffusionskoeffizienten des Proteins von $D = 10^{-6}\text{cm}^2\text{s}^{-1}$). Das heisst, dass von den 10^{13} pro

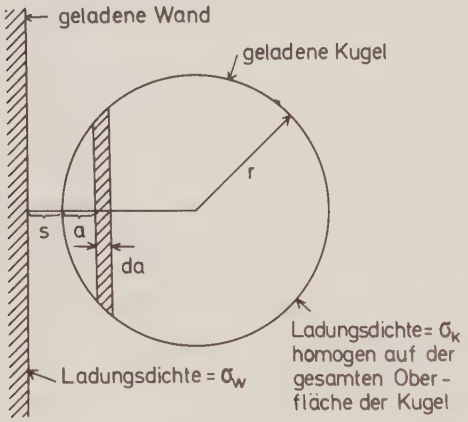
cm^2 gebundenen Molekülen unter diesen Umständen in 10 Stunden weniger als 1% abgelöst werden.

Im Prinzip lässt sich die Gleichgewichtskonzentration aus der Theorie der elektrischen Doppelschicht berechnen, wenn das Cytochrom-c-Molekül als geladene Kugel betrachtet wird, die mit einer entgegengesetzt geladenen ebenen Wand bei gegebener Ionenstärke in Wechselwirkung tritt. Die genaue Theorie ist aber wegen der speziellen Randbedingungen schwierig, und das Problem ist bis jetzt nicht gelöst worden.[46] Qualitativ kann die starke Abhängigkeit der Bindung von der Ionenstärke folgendermassen eingesehen werden: Das elektrische Potential der geladenen Oberfläche fällt über eine Distanz von der Grössenordnung der Debye-Hückel-Länge $1/\varkappa$ auf Null ab. Die Debye-Hückel-Länge ist eine Funktion der Ionenstärke J; z. B. gilt $1/\varkappa \simeq 100$ Å für $J = 10^{-3}$M, aber $1/\varkappa \simeq 3$ Å für J = 1 M. Das Cytochrom-c-Molekül besitzt einen Durchmesser von 31 Å. Bei einer Ionenstärke $J = 10^{-3}$M tritt somit die gesamte Ladung des Moleküls mit der geladenen Wand in Wechselwirkung. Bei einer Ionenstärke von J = 1 M trägt dagegen nur ein kleiner Teil der geladenen Gruppen zur Bindung bei. Die Berechnung eines einfachen Modelles, das auf dieser Vorstellung beruht, wird im Anhang gegeben. Das Modell liefert eine äusserst starke Abhängigkeit der Bindung von der Ionenstärke.

A N H A N G

1. Ein einfaches Modell für die Adsorption von Cytochrom-c an eine geladene Lipidschicht

Wir betrachten das Cytochrom-c-Molekül als eine Kugel mit einer positiven, homogenen Oberflächenladungsdichte σ_K. Die Lipidschicht stellen wir durch eine negativ geladene Wand mit der Ladungsdichte σ_W dar (vgl. Figur 28). Die geladene Kugel und die geladene Wand sind in einer Elektrolytlösung der Konzentration c.



Figur 28: Die Lipidschicht wird durch eine geladene Wand mit der homogenen Ladungsdichte σ_W, das Cytochrom-c-Molekül durch eine geladene Kugel mit der homogenen Oberflächenladungsdichte σ_K dargestellt.

Das Potential der geladenen Wand wird dann nach der Theorie von Gouy-Chapman approximiert durch den Ausdruck

$$\varphi_{(x)} = \varphi_o \, e^{-\varkappa x} \quad ; \tag{16}$$

dies gilt dann streng, wenn $|\varphi_o| \ll kT/e_o$ ist.

k = Boltzmann-Konstante
T = Temperatur
e_o = Elementarladung
$\frac{1}{\varkappa} = 1.988 \cdot 10^{-10} \sqrt{\frac{\varepsilon T}{J}}$ [cm] Debye-Hückel-Länge
ε = Dielektrizitätskonstante
J = Ionenstärke

Die potentielle Energie der geladenen Kugel lässt sich dann unter den folgenden vereinfachenden Annahmen berechnen:
1. Die Ionenatmosphäre des Proteins kann vernachlässigt werden.
2. Die Dielektrizitätskonstante des Proteins sei gleich der Dielektrizitätskonstante der Lösung.
3. Das Potential der Wand wird durch die adsorbierten Proteinmoleküle nicht beeinflusst.

Wegen der Annahme 3 gilt die Rechnung streng nur für kleine Bedeckungsdichten.

Mit den Bezeichnungen der Figur 28 erhalten wir für die potentielle Energie W den Ausdruck

$$(17) \qquad W = \int_0^{2r} 2\pi r \sigma_K \varphi_o e^{-\varkappa(s+a)} da$$

Bei dichtester Packung beansprucht ein Proteinmolekül die Fläche $F = 2 \cdot \sqrt{3} \cdot r^2$; mit der"Wertigkeit" z_W wird dann

$$(18) \qquad \sigma_W = -\frac{z_W e_o}{2\sqrt{3} r^2} \qquad e_o = \text{Elementarladung}$$

Entsprechend erhalten wir, wenn wir mit z_p die "Wertigkeit" des Proteinmoleküls bezeichnen

$$(19) \qquad \sigma_K = \frac{z_p e_o}{4\pi r^2} \quad .$$

Der Fundamentalsatz der Elektrostatik liefert uns zwischen σ_W und φ_o die Beziehung

(20) $$-\varepsilon_o \varepsilon \left(\frac{d\varphi}{dx}\right)_{x=o} = \sigma_W \ ;$$

daraus folgt mit Gleichung (16)

(21) $$\varphi_o = \frac{\sigma_W}{\varepsilon_o \varepsilon \varkappa}$$

Durch Einsetzen von (18), (19) und (21) und Integration erhalten wir schliesslich

(22) $$w \equiv \frac{W}{kT} = - \frac{z_p z_W}{\varkappa^2 r^2} \frac{2\pi q_o}{r\varepsilon\sqrt{3}} e^{-\varkappa s} \left(1 - e^{-2\varkappa r}\right)$$

mit $$q_o \equiv \frac{e_o^2}{8\pi\varepsilon_o kT} \simeq 282 \text{ Å} \quad (25^oC)$$

Die Konzentration der Proteinmoleküle im Abstand s von der Wand ist dann proportional dem Boltzmann-Faktor $e^{-W/kT}$; d. h. es gilt

(23) $$c(s) = c_o e^{-w}$$

Mit Hilfe dieser Beziehung können wir dann die Flächendichte der adsorbierten Proteinmoleküle berechnen:

(24) $$\Gamma = \int_0^\infty [c(s) - c_o] \, ds$$

Durch Einsetzen von (22) und (23) erhalten wir

(25) $$\Gamma = \frac{c_o}{\varkappa} [Ei(\alpha) - \ln\alpha - \gamma] \qquad (\alpha > 0)$$

mit $$\alpha \equiv \frac{z_p z_W}{\varkappa^2 r^2} \frac{2\pi q_o}{\varepsilon r\sqrt{3}} \left(1 - e^{-2\varkappa r}\right)$$

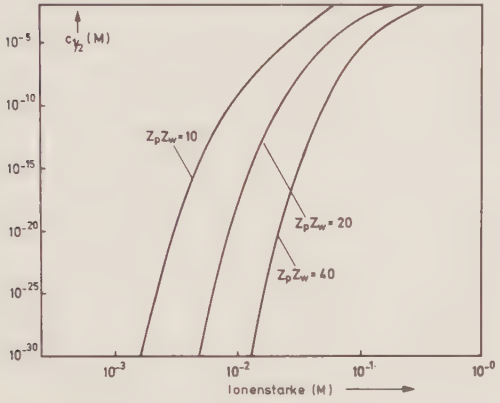
und $$\gamma = 0.577 \quad \text{(Euler'sche Konstante)} .$$

Ei (α) bedeutet das Exponentialintegral. $\Gamma_{Max} = \frac{1}{2\sqrt{3}\, r\, N_L}$ ist die Flächendichte (in Mol/cm^2) bei hexagonal dichtester Packung (N_L = Loschmidt'sche Zahl). Bezeichnen wir mit $c_{1/2}$ die Konzentration in der Lösung in grosser Entfernung von der Wand, bei

welcher $\Gamma = \frac{1}{2}\Gamma_{Max}$ wird, so erhalten wir mit (25)

$$(26) \qquad c_{1/2} = \frac{\varkappa}{4\sqrt{3}\, r^2 N_L} \frac{1}{Ei\,(\alpha) - \ln(\alpha) - \gamma} \quad .$$

In Figur 29 ist die Grösse $c_{1/2}$ bei verschiedenen konstanten $z_p z_W$-Werten als Funktion der Ionenstärke aufgetragen.



Figur 29: Die Konzentration $c_{1/2}$ als Funktion der Ionenstärke der Lösung.

$c_{1/2}$ = Proteinkonzentration, bei welcher die halbe Oberfläche bedeckt ist

z_p = Anzahl der Ueberschussladungen des Proteinmoleküls

z_W = Anzahl der Ueberschussladungen auf der Fläche $2\sqrt{3}r^2$ (r = Radius des Proteinmoleküls)

Aus den Kurven ist ersichtlich, dass bei kleinen Ionenstärken (10^{-2}M) schon eine sehr kleine Proteinkonzentration (10^{-20}M) genügt, um die Wand mit einer Proteinschicht zu bedecken. Der steile Verlauf der Kurven bedeutet, dass bereits eine kleine Aenderung der Ionenstärke die Konzentration $c_{1/2}$ um mehrere Zehnerpotenzen ändert.

Dieses einfache Modell vermag also die in Abschnitt B (S. 35 ff.) behandelte Adsorption von Cytochrom-c an Inositol-

schichten qualitativ zu erklären. Insbesondere wird die Stabilität der Adsorption bei kleinen Ionenstärken und das Ablösen der Cytochrom-c-Moleküle von der Lipidschicht bei einer kleinen Aenderung der Ionenstärke verständlich.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Zur Untersuchung von mono- bzw. bimolekularen Lipidschichten mit angelagerten Pigmentmolekülen wurde eine Apparatur entwikkelt, die entweder als Einstrahlspektrometer oder als Differentialphotometer verwendet werden kann. Bei der Verwendung als Einstrahlspektrometer waren Extinktionen von der Grössenordnung $5 \cdot 10^{-4}$ noch messbar, bei der Verwendung als Differentialphotometer noch solche der Grössenordnung $5 \cdot 10^{-5}$.

2. Mit Hilfe des Differentialphotometers konnten erstmals reproduzierbare Absorptionsmessungen an "schwarzen", etwa 100 Å dikken Lipidmembranen durchgeführt werden. So konnte Chlorophyll-a in Dioleoyllecithinmembranen quantitativ nachgewiesen werden. Indirekt konnte auch die Einlagerung von Vitamin-K_1-Molekülen in die "schwarze" Membran verfolgt werden. Die Absorptionsmessungen sind konsistent mit entsprechenden Fluoreszenzmessungen an chlorophyllhaltigen Dioleoyllecithinmembranen. Die Ergebnisse der Absorptions- und Fluoreszenzmessungen liefern das Bild einer bimolekularen Lipidmembran, in deren Grenzflächen Chlorophyll-a-Moleküle eingebaut sind. Messungen mit β-Carotin ergaben, dass verglichen mit Chlorophyll-a mindestens 10 mal weniger β-Carotin-Moleküle in die Membran eingebaut wurden, was auf das Fehlen einer hydrophilen Gruppe beim β-Carotin-Molekül zurückgeführt wird.

3. Zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Cytochrom-c und Lipid wurden zwei verschiedene Modellsysteme verwendet: Bimolekulare Membranen und monomolekulare Schichten vom Langmuir-Blodgett-Typ. Es konnte spektralphotometrisch nachgewiesen werden, dass bei niedriger Ionenstärke in der wässrigen Phase Cytochrom-c an eine Phosphatidyl-Membran adsorbiert wird. Bei Ionenstärken $< 10^{-3}$M werden etwa 10^{13} Moleküle pro cm^2 der Lipidoberfläche gebunden. Dies entspricht gerade der Flächendichte von Cytochrom-c-Molekülen in einer dicht besetzten monomolekularen Schicht. Daraus ergibt sich für dieses molekulare System eine dem Davson-Danielli-Modell für biologische Membranen entsprechende Struktur. Es wurde gezeigt, dass die Bindung vor allem durch elektrostatische Wechselwirkung zwischen dem positiv ge-

ladenen Cytochrom-c und der negativ geladenen Lipidmembran zustande kommt. So wird mindestens 20 mal weniger Cytochrom-c an eine ungeladene Dioleoyllecithin-Membran gebunden als an eine geladene Phospatidylinositol-Membran. Bei Ionenstärken $\geqslant$ 0.1 M wird kein Cytochrom-c mehr an PI-Membranen adsorbiert. Besonders gut liess sich die Wechselwirkung an den auf Glasplättchen aufgezogenen monomolekularen Phosphatidylinositol-Schichten (vom Langmuir-Blodgett-Typ) untersuchen. Bei diesen Schichten ergab sich ebenfalls eine starke Abhängigkeit der Cytochrom-c-Adsorption von der Ionenstärke. Bei kleinen Ionenstärken (10^{-3}M) bildet sich auf der Lipidoberfläche eine nahezu dicht gepackte monomolekulare Cytochrom-c-Schicht. Versuche in Phosphatpuffer- und KCl-Lösungen ergaben den Hinweis, dass es sich um reine Ionenstärkeeffekte handelt. Für eine elektrostatische Wechselwirkung spricht auch das pH-Verhalten der Adsorption und die Beobachtung, dass die Adsorption diffusionskontrolliert ist. Das gebundene Cytochrom-c konnte mit Ascorbat reduziert werden. Im Gegensatz zu Ferrocytochrom-c in wässriger Lösung wurde das gebundene Cytochrom-c durch O_2 oxidiert.

4. Im Anhang wird ein einfaches Modell für die elektrostatische Wechselwirkung von Cytochrom-c mit einer geladenen Lipidschicht diskutiert.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. P. Mueller, D.O. Rudin, H.T. Tien, W.C. Wescott
   Nature 194, (1962), 979
2. P. Läuger
   Naturwissenschaften (erscheint demnächst)
3. H.T. Tien, A.L. Diana
   Chem. Phys. Lipids 2, (1968), 55
4. J.F. Danielli, H.A. Davson
   J. cell. comp. Physiol. 5, (1935), 495
5. R.B. Park
   in "The Chlorophylls", Academic Press (1966), New York, London, S. 283
6. G. Rouser, G.J. Nelson, S. Fleischer, G. Simon
   in "Biological Membranes", Academic Press (1968), New York, London, S. 40
7. Landolt-Börnstein Tabellen
8. E. Margoliash, N. Frohwirt
   Biochem. J. 71, (1959), 570
9. E. Rabinowitch
   in "Photosynthesis", Interscience Publishers (1945), New York, Vol. I, S. 448
10. J.P. Keene
    Rev. Sci. Instr. 34, (1963), 1220
11. G. Kortüm
    in "Kolorimetrie, Photometrie und Spektrometrie", Springer-Verlag (1962), Berlin, S. 19 und S. 153
12. Kohlrausch
    Praktische Physik Bd. II, B.G. Teubner-Verlag, Stuttgart, S. 373
13. C.G. Cannon
    in "Electronics for Spectrocopists", Hilger + Watts Ltd. (1960), London, S. 156
14. W. Schottky, S. Spenke
    Wiss. Veröff. Siemenswerke 16, (1937), 1
15. H. Frieser, P. Brandt
    Zeitschr. Photogr., Photophys., Photochem. 59, (1965), 87
16. N.R. Nail, F. Moser, F. Urbach
    JOSA 46, (1956), 218

17. P. Frauenfelder, P. Huber
in "Einführung in die Physik", Reinhardt-Verlag (1958), Basel, Bd. II, S. 165
18. K.B. Blodgett, I. Langmuir
Phys. Rev. 51, (1937), 964
19. G.L. Gaines
in "Insoluble Monolayers", John Wiley (1966), New York, S. 45
20. E.C. Robles, D. von den Berg
Biochim. Biophys. Acta 187, (1969), 520
21. W.E. Trevelyan
J. Lipid Res. 7, (1966), 445
22. R. Havez
Bull. Soc. Chim. Biol. 48, (1966), 117
23. E. Margoliash, J. Lustgarten
J. Biol. Chem. 237, (1962), 3397
24. L.G. Howell, I. Fridovich
J. Biol. Chem. 243, (1968), 5941
25. P. Läuger, W. Lesslauer, E. Marti, J. Richter
Biochem. Biophys. Acta 135, (1967), 20
26. R.J. Cherry, D. Chapman
J. Mol. Biol. 40, (1969), 19
27. B. Ke
in "The Chlorophylls", Academic Press (1966), New York, London, S. 268
28. F.A. Henn, G.L. Decker, J. W. Greenawalt, T.E. Thompson
J. Mol. Biol. 24, (1967), 51
29. C. Huang, T.E. Thompson
J. Mol. Biol. 13, (1965), 183
16, (1966), 566
30. H.T. Tien, E.A. Dawidowicz
J. Col. Interf. Sci. 22, (1966), 438
31. F.A. Henn, T.E. Thompson
J. Mol. Biol. 31, (1968), 227
32. M. Gouterman
J. Mol. Spectra 6, (1961), 138
33. N. Alamuti
Diss. (1970), Basel
34. J.B. Thomas
in "Primary Photoprocesses in Biology", John Wiley (1965),

New York, S. 80

35. W.D. Bellamy, G.L. Gaines, A.G. Tweet
J. Chem. Phys. 39, (1963), 2528

36. R.E. Dickerson, M.L. Kopka, C.L. Borders, J. Varnum, J.E. Weinzierl
J. Mol. Biol. 29, (1967), 77

37. G.L. Clark, R.R. Sterret, P.W. Leppla
J. Am. Chem. Soc. 57, (1935), 330

38. C. Holley, S. Bernstein
Phys. Rev. 49, (1936), 403

39. G.H. Barlow, E. Margoliash
J. Biol. Chem. 241, (1966)

40. D. Papahadjopoulos
Biochim. Biophys. Acta 163, (1968), 240

41. E. Margoliash, A. Schejter
Adv. Prot. Chem. 21, (1966), 217 und 255

42. P. Frank, R. v. Mises
in "Die Diff.- und Integralgleichungen d. Mech. und Physik", Dover Publ. (1961), New York

43. A. Ehrenberg, S. Paléus
Acta chem. scand. 9 (1955), 583

44. P.J. Quinn, R.M.C. Dawson
Biochem. J. 113, (1969a), 791

45. P.J. Quinn, R.M.C. Dawson
Biochem. J. 115, (1969b), 65

46. E.J.W. Verwey, J.Th.G. Overbeek
in "The theory of the stability of lyophobic colloids", Elsevier (1948), Amsterdam

L E B E N S L A U F

Ich, Adrian Steinemann, wurde am 27. Juli 1941 in Basel geboren. Nach Abschluss der Primar- und Realschule in Basel bereitete ich mich am hiesigen Institut Athenäum auf die Eidgenössische Maturität Typus C vor und erwarb diese im Frühjahr 1961. Ich immatrikulierte mich an der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel und studierte Physikalische Chemie im Hauptfach. Die Nebenfachexamen in Chemie, Physik und Mathematik bestand ich im Herbst 1965, Frühjahr 1967 und Sommer 1970. Im Frühjahr 1967 begann ich die vorliegende Dissertation unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. P. Läuger. Daneben betätigte ich mich im Sommersemester 1968 und im Wintersemester 1968/69 als Praktikumsassistent. Seither bin ich für die Deutsche Forschungsgesellschaft tätig.

Während meines Studiums besuchte ich die Vorlesungen und Praktika der Herren Professoren und Dozenten K. Alder, E. Baldinger, E. Baumgartner, F. Blumer, P. Buchner, R. Conzelmann, P. Diehl, M. Eichler, H. Erlenmeyer, S. Fallab, M. Geiger-Huber, C. Grob, F. Grün, E. Heilbronner, H. Huber, P. Huber, P. Läuger, P. Leepin, E. Miescher, H. Mohler, H. Salmony, P. Scherrer, H.R. Striebel, Ch. Tamm, M. Thürkauf, R. Wagner.